

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

THÈSE PRÉSENTÉE À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE
(NEUROSCIENCES)

PAR
YAN BERGERON

LES PROTÉINES AKT3-GSK3-MTOR DANS LA RÉGULATION DE
COMPORTEMENTS LIÉS AUX ÉMOTIONS, À LA MÉMOIRE ET
À LA MOTRICITÉ CHEZ LA SOURIS

JUILLET 2019

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

Cette thèse a été dirigée par :

Michel Cyr, Ph. D.

Université du Québec à Trois-Rivières

Jury d'évaluation de la thèse :

Michel Cyr, Ph. D.

Université du Québec à Trois-Rivières

Marc Germain, Ph. D.

Université du Québec à Trois-Rivières

Carlos Reyes-Moreno, Ph. D.

Université du Québec à Trois-Rivières

Pierre J. Blanchet, Ph. D.

Université de Montréal

Thèse soutenue le 25 juin 2019

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier sincèrement mon directeur de recherche Michel Cyr. Son ouverture d'esprit m'a offert l'opportunité de mettre à terme des projets qui me tenaient à cœur et ces précieux conseils m'ont permis d'accomplir des études au-delà de ce que j'aurais pu imaginer.

Je ne peux pas passer sous silence l'apport de mes collègues du laboratoire. En premier lieu, je tiens à remercier ma collègue de travail Geneviève Bureau. Sa patience, son expérience et nos nombreuses discussions ont fait en sorte que j'ai eu la chance de développer mon plein potentiel. Je garderais toujours de riches souvenirs et tu as été une complice de très grande qualité pendant mes études. Aussi, je tiens à remercier Laure Chagniel et Bruno Ouimet qui m'ont accompagné dans les bons comme dans les moins bons moments. Les journées au laboratoire ont toujours été meilleures en votre compagnie. Enfin, je remercie le personnel du département de biologie médicale, dont spécialement Catarina Leote Franco Pio, Drs Guy Massicotte, Éric Asselin et Marc Germain.

J'ai la chance d'avoir une famille et des amis qui m'ont appuyé tout au long de mon parcours académique. Mes parents ont toujours eu de bons mots pour me motiver. Parmi mes bons amis, je dois souligner le soutien inestimable de François Fabi. D'avoir eu la chance de rencontrer cette personne pendant mes études a été une source de motivation continue. Finalement, je remercie de tout cœur ma conjointe Mélanie qui m'accompagne depuis le début de cette grande aventure.

Je remercie également l'aide financière du Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) et de l'Université du Québec à Trois-Rivières. La bourse d'excellence à l'admission ainsi que les nombreuses bourses d'aide à la diffusion ont fait toute la différence pendant mon cheminement académique.

RÉSUMÉ

Comment sommes-nous capables de mémoriser le chemin pour nous rendre chez un ami? Comment faisons-nous pour effectuer une tâche motrice fluide et coordonnée? Qu'est-ce qui fait en sorte que certains de nos comportements soient modifiés lorsqu'une pathologie affecte nos émotions? Il s'agit des nombreuses questions auxquelles plusieurs scientifiques tentent de trouver réponse. Il est connu que la régulation adéquate de protéines au sein de voies de signalisation cellulaire module nos comportements quotidiens. Parmi ces protéines, il y a un intérêt grandissant pour Akt, GSK3 et mTOR. Il apparaît que ces protéines participent aux mécanismes de plasticité synaptique et permettent la mémorisation de différents apprentissages. De plus, certaines études soulignent que la dérégulation de leur activité est associée au développement ainsi qu'aux anomalies comportementales de certaines maladies, dont la maladie de Parkinson, la schizophrénie et la bipolarité. Malgré tout, il y a encore beaucoup à découvrir quant à leur rôle précis. La protéine Akt est retrouvée sous trois isoformes : Akt1, Akt2 et Akt3. Majoritairement étudiée dans son ensemble, de plus en plus d'études suggèrent qu'il y a des différences fonctionnelles entre les isoformes. Étonnamment, l'isoforme Akt3 est la plus exprimée au cerveau, mais son rôle dans les fonctions cérébrales n'est pas encore bien connu. D'autre part, même si la protéine mTOR a déjà été associée à la régulation de différents comportements et à diverses formes de mémoire, son implication en condition physiologique à la régulation des habiletés motrices ainsi qu'à la mémorisation d'un nouvel apprentissage moteur n'est toujours pas connue. Dans ce contexte, les travaux de recherche présentés dans cet ouvrage se sont intéressés à mieux définir l'implication des protéines Akt3-GSK3-mTOR dans la modulation de comportements liés aux émotions, la mémoire et la motricité.

Afin d'évaluer la participation des protéines Akt3-mTOR dans la régulation des habiletés motrices, nous avons évalué l'exécution, la coordination ainsi que la force musculaire à l'aide de tests comportementaux chez des souris Akt3 KO ainsi que des souris de phénotype sauvage traitées avec de la rapamycine ou un siRNA ciblant mTOR. Particulièrement, l'implication de mTOR aux processus de mémorisation motrice a été réalisée par l'entremise de l'inhibition pharmacologique et génétique de son activité au striatum pendant l'apprentissage d'une tâche motrice complexe. L'implication de la protéine Akt3 à des comportements liés à la mémoire et aux émotions a été évaluée par l'entremise d'une multitude de tests comportementaux. Finalement, en utilisant du lithium chez les souris Akt3 KO, une attention particulière a été portée sur la possible relation entre Akt3-GSK3 et l'effet thérapeutique sur des comportements liés à la dépression ainsi qu'à l'anxiété.

Les résultats de ces travaux montrent que les protéines Akt3-GSK3-mTOR participent de manière différentielle à l'apprentissage et la mémorisation motrice, tout en n'ayant aucun impact sur la régulation des habiletés motrices en condition physiologique. Particulièrement, la signalisation de mTORC1, au niveau du striatum, participe aux processus moléculaires permettant la consolidation d'un nouvel apprentissage moteur.

D'une autre part, ces travaux mettent en évidence que la signalisation Akt3-GSK3 n'est pas essentielle à la mémorisation d'apprentissage associée à l'hippocampe, mais est plutôt nécessaire à la régulation normale de certains comportements retrouvés dans des maladies psychiatriques comme la schizophrénie, la dépression et l'anxiété.

Mots-clés : Akt3, GSK3, mTOR, apprentissage, mémoire, motricité, schizophrénie, dépression, anxiété.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ.....	iv
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	xi
CHAPITRE I	
LES PROTÉINES AKT, GSK3 ET MTOR.....	1
1.1 La protéine Akt.....	1
1.1.1 Distinction entre les isoformes d'Akt	2
1.1.2 Régulation de la protéine Akt	4
1.1.3 Le rôle d'Akt3 au niveau du système nerveux central.....	6
1.2 La protéine GSK3 α/β	8
1.2.1 Distinction entre les isoformes de GSK3.....	8
1.2.2 Régulation de la protéine GSK3	9
1.3 La protéine mTOR.....	12
1.3.1 Distinctions entre les complexes de mTOR.....	13
1.3.2 Régulation de mTORC1	14
CHAPITRE II	
LA MÉMOIRE, LES ÉMOTIONS ET LA MOTRICITÉ	18
2.1 La mémoire : historique.....	18
2.1.1 Hippocampe : structure anatomique et circuit trisynaptique	18
2.1.2 La plasticité synaptique	20
2.1.3 Mécanismes moléculaires de la LTP à l'hippocampe	21
2.1.4 Les protéines Akt-GSK3-mTOR : mémoire et plasticité synaptique	25
2.2 Les émotions.....	28
2.2.1 Les neurotransmetteurs monoaminergiques	29
2.2.2 La schizophrénie	35
2.2.3 Les protéines Akt-GSK3 dans la schizophrénie	37

2.2.4	Les troubles de l'humeur	39
2.2.5	Les protéines Akt-GSK3 dans les troubles de l'humeur.....	41
2.3	La motricité : neurobiologie du mouvement volontaire et apprentissage moteur.....	42
2.3.1	Les ganglions de la base : composition anatomique et connectivité structurale.....	45
2.3.2	Signalisation glutamatergique et dopaminergique au striatum.....	52
2.3.3	Les protéines Akt-GSK3-mTOR dans les fonctions motrices.....	56
CHAPITRE III		
HYPOTHÈSES DE TRAVAIL ET MÉTHODOLOGIES		
COMPORTEMENTALES.....		58
3.1	Quel est l'impact de la délétion d'Akt3 chez la souris sur les comportements associés aux émotions, à la mémoire et à la motricité?	58
3.2	Est-ce que la signalisation de la protéine mTOR est impliquée dans la régulation des habiletés motrices ainsi que dans la mémorisation d'une nouvelle tâche motrice complexe?.....	59
3.3	Outils comportementaux dans un contexte d'étude lié à la mémoire, aux émotions et à la motricité chez la souris	60
CHAPITRE IV		
GENETIC DELETION OF AKT3 INDUCES AN ENDOPHENOTYPE		
REMINISCENT OF PSYCHIATRIC MANIFESTATIONS IN MICE.....		67
4.1	Contribution des auteurs	67
4.2	Résumé de l'article en français.....	68
4.3	Premier article scientifique : Genetic deletion of Akt3 induces an endophenotype reminiscent of psychiatric manifestations in mice	69
	Abstract.....	69
	Introduction.....	70
	Material and methods	71
	Animals.....	71
	Behavioral Tests	72
	Chronic lithium treatment.....	75
	Biochemical analysis	75
	Electrophysiology	76
	Statistical analysis.....	76

Results	77
Levels of Akt isoforms in the Akt3 KO mouse brain	77
Normal motor abilities and cognitive functions in Akt3 KO mice	77
Akt3 KO mice exhibit an endophenotype reminiscent of psychiatric conditions	78
Chronic lithium treatment rescued depressive and anxiety-like behaviors observed in Akt3 KO mice	79
Discussion	80
Conflict of interest statement	85
Author contributions	85
Acknowledgements	85
Figure legends	86
CHAPITRE V	
MTOR SIGNALING CONTRIBUTES TO MOTOR SKILL LEARNING IN MICE	98
5.1 Contribution des auteurs	98
5.2 Résumé de l'article en français	99
5.3 Deuxième article scientifique : Mtor signaling contributes to motor skill learning in mice	100
Abstract	100
Introduction	101
Materials and methods	102
Animals	102
Rotarod	102
Pole test	102
Pharmacological treatments	103
siRNA knockdown	103
Western blot analysis	104
Statistical analysis	105
Results	105
Rotarod learning induced mTOR activation	105
Effect of systemic and intrastriatal inhibition of mTOR on rotarod learning	106

Rapamycin treatments reduced the levels of phosphorylated P70S6K and 4EBP1 in the striatum	107
Intrastriatal infusion of mTOR siRNA altered rotarod learning and decreased the phosphorylation levels of striatal mTORC1 downstream substrates.....	108
Discussion.....	109
Conflict of interest statement.....	112
Author contributions.....	112
Acknowledgements.....	112
References.....	113
Figures	117
CHAPITRE VI	
DISCUSSION	124
6.1 Implication des protéines Akt3-GSK3-mTOR dans l'apprentissage moteur	124
6.2 Les protéines Akt3-GSK3-mTOR dans les habiletés motrices	129
6.3 La modulation différentielle de la phosphorylation de mTOR lors d'un nouvel apprentissage moteur	131
6.4 Les protéines Akt3-GSK3 et la modulation de comportements liés aux maladies psychiatriques	134
6.5 Les protéines Akt3-GSK3 : la mémoire et la plasticité synaptique à l'hippocampe	139
6.6 Diversités fonctionnelles dans la modulation du comportement chez la souris par les isoformes d'Akt.....	140
6.7 Conclusion générale.....	141
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	143

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure		Page
1.1	Structure des trois isoformes d'Akt retrouvées chez l'humain	3
1.2	Schématisation des fonctionnalités partagées et divergentes entre les isoformes d'Akt	4
1.3	Schématisation générale de la régulation d'Akt	6
1.4	Représentation de la protéine GSK3 sous la forme active et inactive	10
1.5	Mécanisme de phosphorylation et d'inhibition de GSK3	11
1.6	Les complexes mTORC1 et mTORC2	14
1.7	Schématisation de la régulation de mTORC1	16
1.8	Schématisation simplifiée de l'interaction entre mTORC1 et ses deux principaux substrats, S6K et 4E-BP	17
2.1	Circuit trisynaptique de l'hippocampe	19
2.2	Mécanisme de la LTP à l'hippocampe	24
2.3	Principales structures impliquées dans les émotions et l'humeur	29
2.4	Les voies dopaminergique, noradrénergique, adrénergique et sérotoninergique au cerveau	31
2.5	Métabolisme des (A) catécholamines (dopamine, noradrénaline et adrénaline) et de la (B) sérotonine	33
2.6	Organisation et implication des structures cérébrales impliquées dans le contrôle du mouvement volontaire	43
2.7	Schéma des diverses phases d'un apprentissage moteur	45
2.8	Les boucles motrices et non motrices des ganglions de la base	46
2.9	Sous-divisions fonctionnelles du striatum chez l'humain et le rongeur	48
2.10	Schématisation des connexions neuronales entre les structures des ganglions de la base	51

2.11	Schématisation simplifiée des signalisations cellulaires médiées par les récepteurs D1 et les récepteurs NMDA au striatum	55
2.12	Les voies de signalisation cellulaire modulées par le récepteur D2 au striatum	56
3.1	Différents tests comportementaux associés à l'évaluation des émotions chez la souris.....	64

Tableau**Page**

2.1	Les familles et les caractéristiques de récepteurs adrénergiques	34
2.2	Les familles et les caractéristiques des récepteurs sérotoninergiques	35

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

4E-BP1/2	eIF4E-binding proteins 1 and 2
AC	Adénylate cyclase
AGC	cAMP-dependent protein kinase A/ protein kinase G
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole-4-propionate
AMPC	Adénosine 3', 5'-monophosphate cyclique
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
CamKII	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II
COMT	Catechol-O-methyl transferase
CREB	cAMP responsive element-binding protein
DAOA	D amino acid oxydase activator
DARPP32	Dopamine- and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein
DEPTOR	DEP domain-containing mTOR-interacting protein
DISC1	Disrupted in schizophrenia 1
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinases 1/2
GAPs	GTPase-Activating Proteins
GIRK	G protein-coupled inwardly rectifying potassium channel
GPe	Globus pallidus externe
GPi	Globus pallidus interne
GRK	G protein – coupled Receptor Kinase
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphate
KO	Knockout
LST8	Lethal with SEC13 protein 8

LTD	Dépression à long terme
LTP	Potentialisation à long terme
MEK1/2	Mitogen-activated protein kinase kinase 1/2
mSin1	Mitogen-Activated Protein Kinase Associated Protein 1
mTOR	Mammalian/mechanistic target of rapamycin
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex 1
mTORC2	Mammalian target of rapamycin complex 2
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NRG1	Neuregulin 1
PBMCs	Cellules mononucléées sanguines périphériques
PKD1	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PHLPP	PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PKA	Protéine kinase A
PPB	Protéine kinase B
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PP1	Protéine phosphatase 1
PP2A	Protéine phosphatase 2A
PP2B	Protéine phosphatase 2B
PRAS40	Proline-rich Akt/PKB substrate 40 kDa
Protor	Protein observed with Rictor 1
PTEN	Phosphatase and tensin homolog

RagA/B/c/d	Rag small GTPases
RAPTOR	Regulatory-associated protein of mTOR
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
Rheb	Ras homolog enriched in brain
Rictor	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
rpS6	Ribosomal subunit protein S6
RTK	Récepteurs tyrosines kinases
S6K1/2	Ribosomal protein S6 kinases 1 and 2
SNC	Substance noire pars compacta
SNr	Substance noire pars reticulata
STEP	Striatal-enriched protein tyrosine phosphatase
TSC1/2	Tuberous sclerosis proteins 1 and 2
VMAT	Transporteur vésiculaire des monoamines

CHAPITRE I

LES PROTÉINES AKT, GSK3 ET MTOR

1.1 La protéine Akt

Les premiers travaux sur la protéine Akt ont été effectués par Staal et ses collaborateurs en 1977. Ces chercheurs tentaient de comprendre pourquoi une lignée de souris, qu'ils avaient nommée Ak, développait spontanément des lymphomes thymiques. Ils ont réussi à isoler le rétrovirus Akt-8 provenant des cellules T localisées dans le thymus. En poursuivant leur recherche, ils démontrèrent que le rétrovirus Akt-8 codait pour un oncogène qu'ils décidèrent d'appeler Akt (Ak pour la lignée de souris; t pour *transforming*) (Manning and Toker 2017). Aujourd'hui, il est reconnu que la protéine Akt est une kinase de 56 kDa appartenant à la famille des sérines/thréonines kinases AGC (*cAMP-dependent protein kinase A/protein kinase G/ protein C*). La famille des sérines/thréonines kinases AGC est hautement conservée parmi les eucaryotes, autant chez les vertébrés que les invertébrés, les mycètes, les plantes et les protistes. Chez les humains, il y a plus de 500 kinases et 12 % d'entre elles proviennent de la famille AGC. Il y a 63 gènes qui codent pour 61 kinases AGC et deux pseudokinases, l'ensemble de ces kinases étant divisé en 14 familles et 21 sous-familles. Les kinases AGC exercent une multitude de fonctions variées et essentielles chez l'humain (Arencibia, Pastor-Flores et al. 2013, Leroux, Schulze et al. 2018). En ce qui concerne la kinase Akt, elle est impliquée dans une multitude de fonctions physiologiques, telles que la croissance cellulaire, la régulation du métabolisme et l'angiogenèse (Manning and Toker 2017). De plus, Akt est associée à une variété de pathologie, dont le cancer, la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Mundi, Sachdev et al. 2016, Nitulescu, Van De Venter et al. 2018).

1.1.1 Distinction entre les isoformes d'Akt

Aujourd'hui, la protéine Akt est aussi connue sous le nom de protéine kinase B (PKB). Chez les mammifères, elle se retrouve sous trois isoformes : Akt1, Akt2 et Akt3 ou PKB α , PKB β et PKB γ . Ces isoformes sont codées par des gènes localisés sur différents chromosomes : 14q32/ 19q13/ 1q43. L'expression de ces isoformes est variable en fonction des tissus : l'isoforme Akt1 est exprimée de façon ubiquitaire, l'isoforme Akt2 préférentiellement exprimée dans les tissus insulino-dépendants et l'isoforme Akt3 est essentiellement exprimée dans les testicules ainsi qu'au système nerveux central (Fabi and Asselin 2014). Ces isoformes partagent une forte similarité structurale avec plus de 80 % d'homologie au niveau des séquences d'acides aminés. Les isoformes d'Akt sont constituées de trois principaux domaines fonctionnels (Elghazi, Balcazar et al. 2006) :

- 1) En position N-terminale, il y a le domaine d'homologie pleckstrine (PH) qui est constitué d'environ 100 acides aminés et qui permet les interactions protéine-protéine, protéine-lipide ainsi que la liaison aux phospholipides.
- 2) En position centrale, il y a le domaine catalytique, qui est très semblable à celui d'autres protéines appartenant à la famille des AGC, comme les protéines kinases A et C. C'est aussi à cet endroit que la protéine Akt va être partiellement activée via la phosphorylation des résidus thréonines 308, 309 et 305 pour Akt1, Akt2 et Akt3 respectivement.
- 3) À l'extrémité C-terminale, il y a le domaine régulateur qui contient un motif hydrophobe commun aux protéines de la famille des kinases AGC. Cette région, nécessaire à l'activation complète de la protéine Akt, présente des résidus sérines variables en fonction des isoformes: S473 (Akt1), S474 (Akt2) et S472 (Akt3).

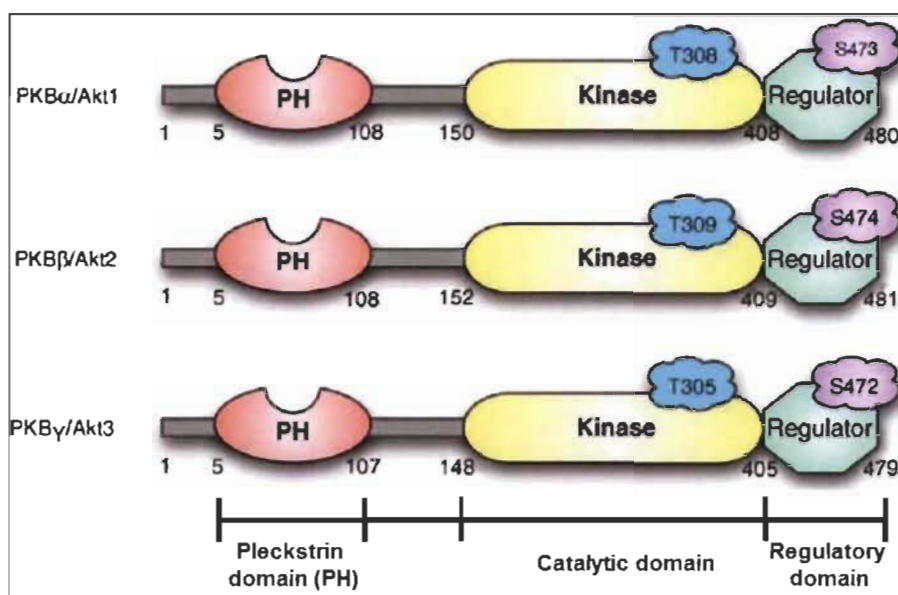


Figure 1.1 Structure des trois isoformes d'Akt retrouvées chez l'humain.

Chaque isoforme est constituée d'un domaine PH rouge en position N-terminale, suivi du domaine catalytique jaune en position centrale et du domaine régulateur turquoise à l'extrémité C-terminale. (Tirée de (Elghazi, Balcazar et al. 2006).)

Plusieurs groupes de recherche ont créé des souris knockout (KO) pour chacun des isoformes afin de mieux comprendre leurs fonctions respectives. La délétion d'Akt1 induit un taux de mortalité néonatale plus grand et les souris survivantes ont une masse corporelle réduite de 15 à 20 % (Chen, Xu et al. 2001, Cho, Thorvaldsen et al. 2001). Les souris Akt2 KO développent un phénotype semblable au diabète humain, mais aucune malformation et mortalité à la naissance ne sont relevées (Cho, Mu et al. 2001, Garofalo, Orena et al. 2003). Enfin, les souris Akt3 KO ont un cerveau plus petit, résultant d'un moins grand nombre et d'une réduction de la taille des neurones (Easton, Cho et al. 2005, Tschopp, Yang et al. 2005). D'autres études subséquentes ont étudié l'effet de la combinaison de la délétion de plusieurs isoformes. La délétion combinée d'Akt1 et d'Akt2 induit des anomalies développementales au niveau de la peau, des os, des muscles et ces souris meurent peu de temps après la naissance (Peng, Xu et al. 2003). Dans le même ordre d'idée, les souris Akt1/Akt3 KO ne survivent pas pendant l'embryogenèse, car la délétion combinée provoque de graves anomalies développementales, principalement au niveau du système cardiovasculaire et du système nerveux central (Yang, Tschopp et al. 2005). Contrairement aux souris Akt1/Akt3 KO, les souris Akt2/Akt3 KO survivent

pendant l'embryogenèse. Toutefois, ces souris présenteront, à la naissance, un poids réduit, des organes moins volumineux et une intolérance au glucose ainsi qu'à l'insuline (Dummler, Tschopp et al. 2006). Dans cette même étude, il est aussi démontré qu'un seul allèle fonctionnel pour Akt1 (Akt1 +/-, Akt2 -/- et Akt3 -/-) permet à la souris de survivre, mais celle-ci présentera plusieurs anomalies physiologiques. L'ensemble des résultats provenant des études présentées ci-dessus indique que chaque isoforme possède des fonctions à la fois conjointes et distinctives.

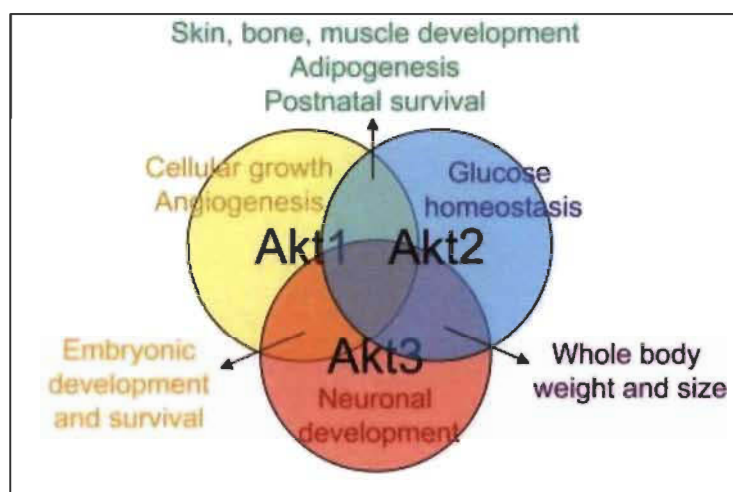


Figure 1.2 Schématisation des fonctionnalités partagées et divergentes entre les isoformes d'Akt. (Tirée de (Saldivar-Gonzalez, Campos-Rodriguez et al. 2009).)

1.1.2 Régulation de la protéine Akt

L'activation de la voie de signalisation d'Akt se réalise principalement par deux groupes de récepteurs : les récepteurs tyrosines kinases (RTK) et les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Plusieurs ligands peuvent moduler l'activation de la voie de signalisation d'Akt par ces récepteurs, tels que les facteurs de croissance, l'insuline, les hormones et les neurotransmetteurs (Li and Jope 2010, Duman and Voleti 2012, Manning and Toker 2017). L'association d'un ligand à un RTK ou à un RCPG module l'activation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K). Une fois activée, la PI3K phosphoryle les lipides membranaires phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3). De façon générale, la protéine Akt est

maintenue dans un état inactif par une liaison intramoléculaire entre son domaine PH et son domaine kinase au niveau du cytosol. La formation du PIP3 permet le recrutement de protéines ayant un domaine PH, comme la protéine Akt, à la membrane cytoplasmique. Une fois Akt ancrée à la membrane cytoplasmique, le PIP3 entraîne un changement de conformation chez Akt, ce qui permet l'exposition des sites de phosphorylation thréonine 308 et sérine 473. La phosphorylation du résidu thréonine 308 est réalisée par la sérine/thréonine *phosphoinositide-dependent kinase-1* (PDK1) et mène à l'activation partielle d'Akt (Alessi, James et al. 1997). Pour une activation complète, Akt doit aussi être phosphorylée à la sérine 473. Les protéines *mammalian target of rapamycin complex 2* (mTORC2) et *DNA-dependent protein kinase* (DNA-PK) sont reconnues pour phosphoryler Akt à la sérine 473 (Feng, Park et al. 2004, Sarbassov, Guertin et al. 2005). À la suite de son activation, Akt se dissocie de la membrane cytoplasmique et se déplace vers le cytoplasme ou le noyau. À ces endroits, Akt pourra phosphoryler à son tour une multitude de substrats afin de réguler de nombreux processus cellulaires (Manning and Toker 2017). La protéine Akt peut aussi être négativement régulée par diverses protéines phosphatases. Parmi les principales candidates, il y a la *phosphatase and tensin homolog* (PTEN), la *PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase* (PHLPP) et la protéine phosphatase 2A (PP2A). La protéine enzymatique PTEN a pour fonction de déphosphoryler le PIP3 en PIP2. La transformation du PIP3 en PIP2 fait en sorte qu'Akt n'est plus recrutée à la membrane et reste sous sa forme inactive dans le cytosol (Song, Salmena et al. 2012). Les protéines PHLPP et PP2A agissent directement sur Akt en déphosphorylant le site sérine 473 ainsi que le site thréonine 308 respectivement.

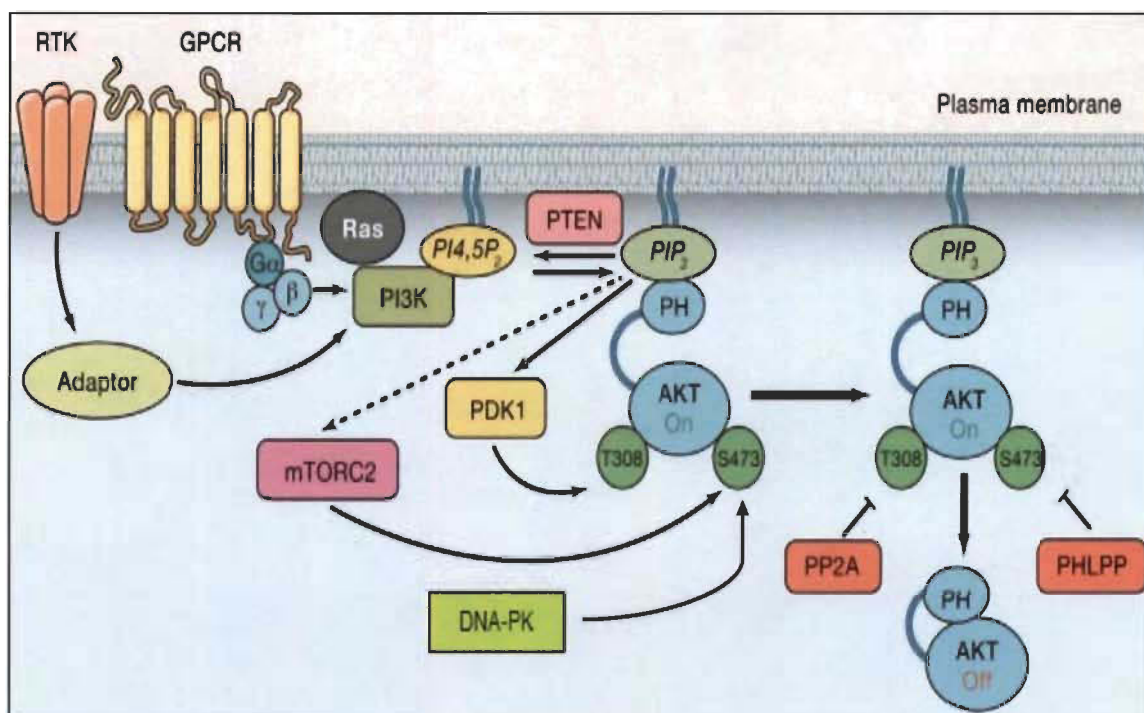


Figure 1.3 Schématisation générale de la régulation d'Akt.

La stimulation des RTK ou des RCPG mène à l'activation de PI3K. Cela induit la production de PIP3 à la membrane plasmique. La protéine Akt, sous sa forme inactive, est recrutée à la membrane et interagit avec PIP3 par l'entremise d'un domaine PH. Cette interaction promeut l'activation d'Akt grâce à la phosphorylation à la thréonine 308 par PDK1 et la phosphorylation de la sérine 473 par mTORC2 ou DNA-PK. RTK, récepteurs tyrosines kinases; RCPG, récepteurs couplés aux protéines G; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PIP3, phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate; PDK1, *phosphoinositide-dependent kinase-1*; mTORC2, *mammalian target of rapamycin complex 2* (mTORC2); DNA-PK, *DNA-dependent protein kinase*. (Tirée et adaptée de (Manning and Toker 2017).)

1.1.3 Le rôle d'Akt3 au niveau du système nerveux central

Bien qu'Akt3 soit l'isoforme la plus exprimée au cerveau, nous en savons encore très peu sur ses fonctions actuelles au système nerveux central. Les prochains paragraphes font une revue des principales études qui impliquent Akt3 dans des fonctions cérébrales.

De récentes études suggèrent que l'isoforme Akt3 serait impliquée dans la croissance neuronale, la régénérescence axonale et la neuroprotection. Une étude *in vitro* illustre que la délétion génétique d'Akt3 dans des cellules d'hippocampe en croissance

diminue significativement la longueur axonale (Diez, Garrido et al. 2012). Une autre étude, réalisée *in vivo*, montre que l'isoforme Akt3, comparativement aux isoformes Akt1 et Akt2, favorise davantage la régénérescence axonale à la suite d'une lésion du nerf optique (Miao, Yang et al. 2016). Finalement, il a été montré qu'à la suite d'une ischémie cérébrale, l'expression constitutive d'Akt3 au niveau du cortex de souris accentue la survie neuronale (Xie, Cheng et al. 2013).

Des études soulignent que l'isoforme Akt3 jouerait un rôle dans la croissance normale du cerveau, autant chez la souris que chez l'humain. Chez les souris, la délétion d'Akt3 cause une réduction significative du volume cérébral (Easton, Cho et al. 2005, Tschopp, Yang et al. 2005). Chez l'humain, la délétion du gène codant Akt3 peut être associée au développement de la microcéphalie, une condition qui se caractérise par la croissance anormalement faible de la boîte crânienne et du cerveau (Nagamani, Erez et al. 2012, Gai, Haan et al. 2015, Depienne, Nava et al. 2017). À l'inverse, d'autres cas cliniques relèvent qu'une suractivation ou une duplication d'Akt3 pourrait causer le développement d'un cerveau trop volumineux (mégaloencéphalie ou hémimégaloencéphalie) (Lee, Huynh et al. 2012, Poduri, Evrony et al. 2012, Riviere, Mirzaa et al. 2012, Nellist, Schot et al. 2015, Takagi, Dobashi et al. 2017). Ces malformations cérébrales, dont l'implication d'Akt3 est suspectée, peuvent occasionner diverses problématiques chez l'individu, dont des troubles cognitifs (Gai, Haan et al. 2015).

La principale maladie qui implique Akt3 et le cerveau est le glioblastome. Il s'agit de la tumeur primitive la plus agressive et la plus fréquente au cerveau (Davis 2016). De nombreuses études soulignent que des mutations, ciblant Akt3, seraient l'une des causes du développement d'un glioblastome ou participeraient aux mécanismes de chimiorésistance liés au traitement de ce type de tumeur (Mure, Matsuzaki et al. 2010, Turner, Sun et al. 2015). Enfin, des études associent une suractivité d'Akt3 à l'épilepsie. Un groupe de recherche a observé, chez une souris ayant subi une mutation qui accentue l'activité d'Akt3, une plus grande susceptibilité à faire des crises d'épilepsie (Tokuda, Mahaffey et al. 2011). Dans le même d'idée, une étude clinique suggère que l'activation

d'Akt3, induite par une mutation, serait responsable des crises d'épilepsie chez le patient (Nellist, Schot et al. 2015).

1.2 La protéine GSK3 α/β

La protéine glycogène synthase kinase 3 (GSK3) est une sérine/thréonine kinase qui a été initialement découverte il y a plus de 30 ans. La première fonction qui lui a été attribuée fut la régulation du métabolisme du glycogène, dont l'origine de son nom (Cohen 1979). Aujourd'hui, il est reconnu que cette protéine régule d'autres processus physiologiques, dont le développement postnatal, la croissance cellulaire, l'inflammation, la neurogenèse ainsi que la morphologie neuronale (Cohen and Frame 2001, Jope, Yuskaitis et al. 2007, Kim, Hur et al. 2011).

1.2.1 Distinction entre les isoformes de GSK3

Chez les mammifères, la protéine GSK3 est encodée par deux gènes qui produisent les isoformes GSK3 α et GSK3 β . La localisation des gènes codant ces isoformes varie en fonction de l'espèce. Chez l'humain, les gènes codant GSK3 α et GSK3 β se retrouvent sur les chromosomes 19 et 3 tandis que chez la souris, les gènes codant GSK3 α et GSK3 β se retrouvent sur les chromosomes 7 et 16. Les isoformes α et β de la protéine GSK3 ont un poids moléculaire de 51 et 47 kDa respectivement (Patel and Woodgett 2017). Ces deux isoformes ont une structure semblable au niveau du domaine kinase, partageant une homologie séquentielle d'environ 98 %. Toutefois, elles se distinguent au niveau de la région N-terminale et de la région C-terminale. En effet, seulement 36 % d'identité est retrouvée dans les parties C-terminales des deux kinases et l'isoforme GSK3 α possède 63 résidus de plus dans la partie N-terminale que l'isoforme GSK3 β (Doble and Woodgett 2003).

Chez l'humain et la souris, GSK3 α et GSK3 β sont exprimées de façon ubiquitaire dans les tissus. Au niveau du cerveau, l'expression des deux isoformes est particulièrement forte pendant l'embryogenèse et quelques jours après la naissance,

pour ensuite diminuer à l'âge adulte (Takahashi, Tomizawa et al. 1994, Lau, Miller et al. 1999, Leroy and Brion 1999). Au niveau du cerveau adulte, l'isoforme GSK3 α semble essentiellement exprimée au niveau de l'hippocampe, du cortex, du cervelet et du striatum. Elle est principalement abondante dans les couches glomérulaires et granulaires du cervelet. En ce qui a trait à GSK3 β , elle est exprimée dans toutes les structures cérébrales. Elle est retrouvée en grande quantité au niveau de la corne d'Ammon et des neurones corticaux de la couche V tandis qu'elle est plus faiblement exprimée au niveau du gyrus denté et des couches corticales superficielles (Takahashi, Tomizawa et al. 1994, Leroy and Brion 1999).

1.2.2 Régulation de la protéine GSK3

La protéine GSK3 est constitutivement active en condition physiologique. En effet, GSK3 est l'une des rares protéines dont l'activité enzymatique est inhibée par des signaux extracellulaires. Étant au centre de nombreuses voies de signalisation, il y a une diversité impressionnante de protéines qui influence l'activité de GSK3 et il apparaît que cette protéine possède plus de 100 substrats. La modulation anormale de l'activité de cette kinase est associée à de nombreuses pathologies humaines, dont les maladies psychiatriques et la maladie d'Alzheimer. Il y aurait quatre principaux mécanismes par lesquels les isoformes de GSK3 sont régulées : (1) inactivation de la fonction kinase de GSK3 α et GSK3 β par phosphorylation des sites sérines 21 et 9 respectivement, (2) modulation du niveau de phosphorylation des sites tyrosines 279 (GSK3 α) et 216 (GSK3 β), (3) changement dans la localisation cellulaire, (4) par l'inactivation de kinases qui phosphorylent les substrats de GSK3 (Kaidanovich-Beilin and Woodgett 2011, Sutherland 2011, Beurel, Grieco et al. 2015).

Parmi ces mécanismes, le plus étudié est sans doute l'inhibition de l'activité enzymatique des isoformes de GSK3 par le biais de la phosphorylation des résidus sérines 9 et 21. Au début des années 2000, il a été identifié par plusieurs équipes de recherche que GSK3 possédait deux domaines fonctionnels : un premier domaine liant des substrats dit *primed* ou pré-phosphorylés et un deuxième domaine kinase responsable

de la phosphorylation des substrats. L'état de pré-phosphorylation des substrats est important, puisque cela permet la liaison à GSK3 au niveau du premier domaine adjacent au deuxième domaine kinase. De cette façon, GSK3 peut phosphoryler le substrat sur une sérine ou une thréonine de la chaîne N-terminale ayant le motif séquentiel S/T-X-X-X-S/T(P). Lorsqu'il y a phosphorylation des résidus sérines 9 et 21 des isoformes de GSK3, cela induit un mouvement de la boucle N-terminale vers le corps de la protéine. Les deux domaines fonctionnels deviennent alors inaccessibles pour les substrats de GSK3 (Cohen and Frame 2001, Patel and Woodgett 2017).

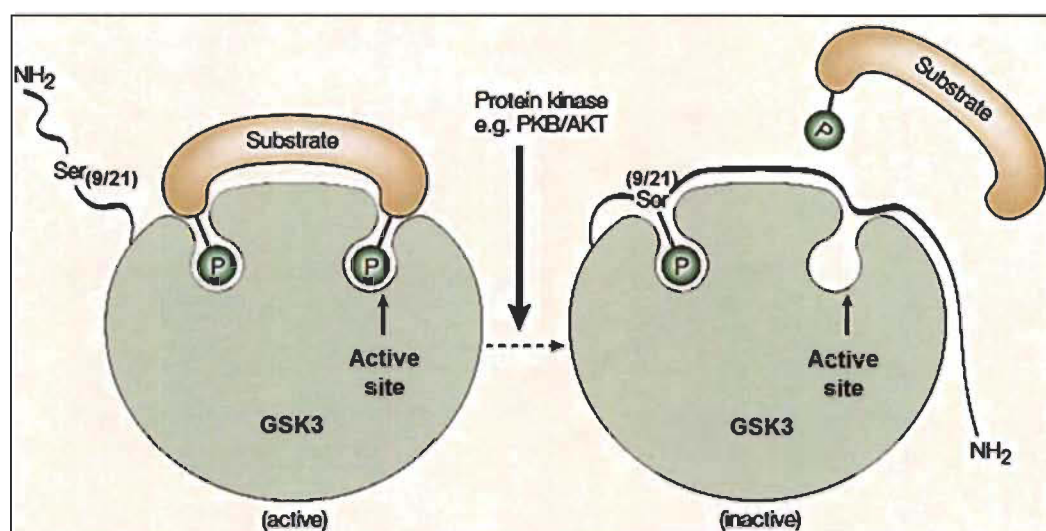


Figure 1.4 Représentation de la protéine GSK3 sous la forme active et inactive. Un substrat dit *primed* s'insère dans le premier domaine, permettant ainsi la phosphorylation du substrat au site actif. La phosphorylation des résidus sérines 9 et 21 induit un mouvement de la boucle N-terminale, ce qui mène à l'inhibition de GSK3. (Tirée et adaptée de (Cohen and Frame 2001).)

L'inhibition de GSK3 par la phosphorylation des résidus sérines 9 et 21 est modulée par une multitude de voies de signalisation, dont celles impliquant PI3K, *mammalian/mechanistic target of rapamycin* (mTOR) et *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). À la suite de la découverte de GSK3, il a été mis en évidence que l'insuline avait pour effet d'induire l'activation de la protéine Akt par la voie PI3K. Lorsque la protéine Akt est active, elle peut directement phosphoryler GSK3 sur les sérines 9/21 de GSK3. Il a été démontré que certains neurotransmetteurs, dont la dopamine, peuvent aussi moduler Akt et par le fait même, modifier l'activité de GSK3. Ce mécanisme signalétique

sera présenté à la section 2.3.3. En ce qui concerne mTOR, son activation par les acides aminés permettrait à la *Ribosomal protein S6 kinases 1 and 2* (S6K1/2; aussi connues sous le nom p70S6K1/2) de phosphoryler et d'inhiber GSK3. Certains facteurs de croissance induisent la conversion de la protéine Ras en Ras-GTP. Cela promeut l'activation de la cascade classique des MAPK et résulte en l'inhibition de GSK3. Enfin, il est à noter que dans certains contextes cellulaires, la déphosphorylation des résidus sérines 9 et 21 par la protéine phosphatase 1 (PP1) et la protéine phosphatase 2 (PP2A), accentue son activité (Hernandez, Langa et al. 2010, Beurel, Grieco et al. 2015, Patel and Woodgett 2017).

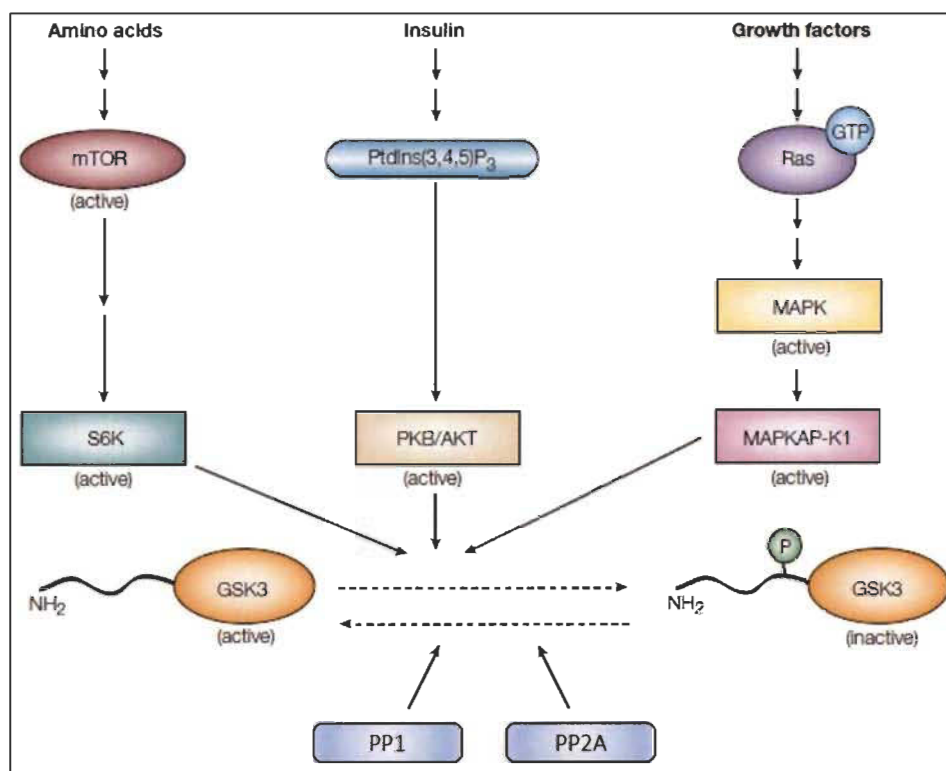


Figure 1.5 Mécanisme de phosphorylation et d'inhibition de GSK3.

L'intégration de différents signaux extracellulaires module les voies de signalisation mTOR, PI3K et MAPK. Cela promeut la phosphorylation et l'inhibition de GSK3. Inversement, la protéine phosphatase 1 (PP1) et la protéine phosphatase 2 (PP2A) activeront GSK3 par déphosphorylation. (Tirée et adaptée de (Cohen and Frame 2001).)

Il apparaît que la modulation du niveau de phosphorylation des sites tyrosines 279 (GSK3 α) et 216 (GSK3 β) puissent avoir un effet sur l'activité de GSK3. Des études *in vitro* montrent que la phosphorylation des sites tyrosines 279 et 216, par les kinases

FYN2 et PYK2, accentue l'activité des isoformes GSK3 α et GSK3 β . De plus, des études montrent que la mutation de la tyrosine 279 sous une forme ne pouvant pas être phosphorylée diminue de 5 à 10 fois l'activité de GSK3. La localisation cellulaire de GSK3 ainsi que la pré-phosphorylation des substrats de cette kinase auront aussi un impact sur son activité. D'une part, il est traditionnellement considéré que GSK3 se retrouve dans le cytosol. Toutefois, GSK3 peut aussi se retrouver à l'intérieur de la mitochondrie ainsi qu'au noyau. La localisation de GSK3 à la mitochondrie serait importante en situation de stress oxydatif et dans la régulation de certaines conditions apoptotiques. Au noyau, GSK3 aurait la capacité de réguler l'expression de plusieurs gènes en interagissant avec différents facteurs de transcription, dont FOS, CREB, NFAT, myc et NF- κ B. D'autre part, tel qu'il a déjà été mentionné, GSK3 reconnaît majoritairement des substrats pré-phosphorylés. En effet, si le substrat de GSK3 n'est pas préalablement phosphorylé, il ne peut pas s'insérer correctement dans le premier domaine fonctionnel. Dans cette position, le substrat ne peut interagir avec le domaine kinase de GSK3 (Beurel, Grieco et al. 2015, O'Leary and Nolan 2015).

1.3 La protéine mTOR

Dans les années 1970, un groupe de recherche de Montréal a découvert que la bactérie *Streptomyces hygroscopicus* pouvait produire un macrolide antifongique. Ce macrolide fut nommé rapamycine en référence à son lieu de découverte, *Rapa Nui*, correspondant au nom polynésien de l'île de Pâques. À la suite de cette découverte, il a été démontré que la rapamycine possédait des propriétés immunosuppressives. Au début des années 90, les gènes TOR1 et TOR2 furent identifiés comme les médiateurs de la rapamycine chez la levure et quelques années plus tard, des expériences biochimiques ont permis d'identifier la protéine mTOR comme étant la cible de la rapamycine chez les mammifères (Saxton and Sabatini 2017).

La protéine mTOR est une sérine/thréonine kinase de 289 kDa évolutivement conservée. Chez l'humain, le gène codant la protéine mTOR se retrouve sur le chromosome 1 tandis que chez la souris, il se retrouve sur le chromosome 4.

Elle est exprimée de manière ubiquitaire dans toutes les cellules. Au niveau du système nerveux central, mTOR est fortement exprimée dans les neurones (Bockaert and Marin 2015, Saxton and Sabatini 2017). Cette kinase régule une multitude de fonctions physiologiques, telles que la croissance cellulaire, la survie cellulaire, l'autophagie, la traduction de nouvelles protéines et la transcription d'ARNm (Saxton and Sabatini 2017). La dérégulation de cette protéine est aussi associée à diverses pathologies, dont le cancer, l'épilepsie et la maladie d'Alzheimer (Laplane and Sabatini 2009, Laplane and Sabatini 2012, Yang, Rudge et al. 2013, Bockaert and Marin 2015).

1.3.1 Distinctions entre les complexes de mTOR

La protéine mTOR peut s'associer avec d'autres protéines afin de former deux complexes distinctifs : mTORC1 et mTORC2. Les deux complexes contiennent la kinase mTOR qui s'associe avec les protéines *lethal with SEC13 protein 8* (LST8), *DEP domain-containing mTOR-interacting protein* (DEPTOR) et le complexe Tti1/Tel2 (Kaizuka, Hara et al. 2010, Kim, Cook et al. 2017). Les connaissances actuelles montrent que les partenaires spécifiques de mTORC1 sont : *regulatory-associated protein of mTOR* (Raptor) et *proline-rich Akt/PKB substrate 40 kDa* (PRAS40). Le rôle de ces protéines est de favoriser l'assemblage du complexe, de permettre le recrutement des substrats et d'agir à titre de régulateur (Hara, Maruki et al. 2002, Kim, Sarbassov et al. 2002, Sancak, Thoreen et al. 2007, Vander Haar, Lee et al. 2007). Les partenaires propres à mTORC2 sont les protéines *rapamycin-insensitive companion of mTOR* (Rictor) et *mitogen-activated protein kinase associated protein 1* (mSin1). Ces protéines définissent l'intégrité structurelle et modulent l'activité de mTORC2 (Oh and Jacinto 2011, Kennedy and Lamming 2016).

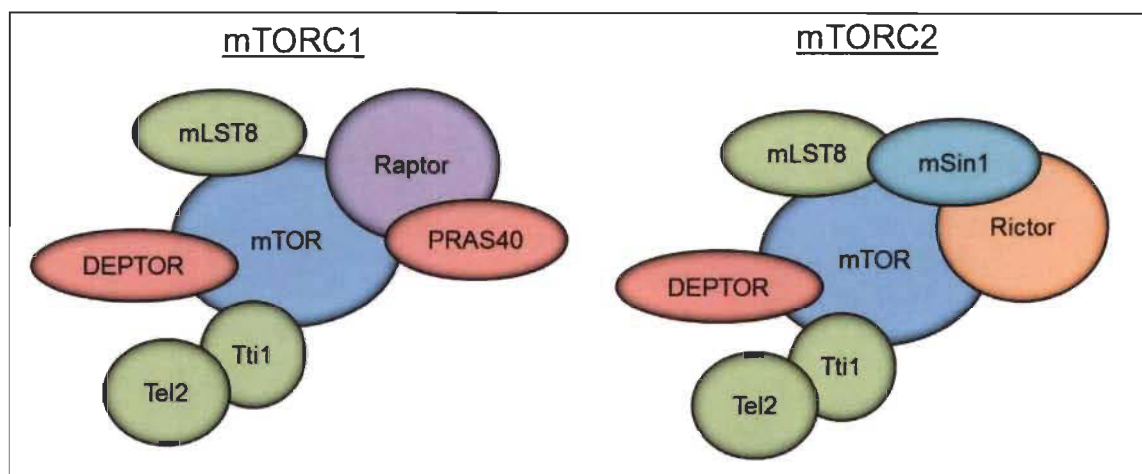


Figure 1.6 Les complexes mTORC1 et mTORC2.

La formation de mTORC1 nécessite l'association de mTOR avec les protéines Raptor et PRAS40 tandis que la formation du mTORC2 nécessite la participation des protéines Rictor et de mSin1. (Tirée et adaptée de (Kim, Cook et al. 2017).)

1.3.2 Régulation de mTORC1

Pour le bénéfice de cette thèse, les pages suivantes se concentrent essentiellement sur la régulation de mTORC1. Une grande diversité de signaux extracellulaires et intracellulaires peut moduler la voie de signalisation mTORC1. Il est démontré que la voie de signalisation de mTORC1 peut être induite par des facteurs de croissance, par le statut énergétique de la cellule et par les acides aminés. L'intégration de ces signaux nécessite l'implication d'une multitude de récepteurs, comme les RTK, les récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs canaux-ioniques et les récepteurs aux cytokines (Kitagishi, Kobayashi et al. 2012, Bockaert and Marin 2015).

De façon générale, il est reconnu que la régulation de mTORC1 à l'intérieur de la cellule s'effectue principalement grâce à l'hétérodimère *tuberous sclerosis protéines 1 and 2* (TSC1/2). Cet hétérodimère, composé de la protéine *Hamartin* (TSC1) et de la protéine *Tuberin* (TSC2), possède une fonction *GTPase-Activating Proteins* (GAPs). Cette fonction permet l'hydrolyse du groupement GTP lié à la protéine *Ras homolog enriched in brain* (Rheb), qui se retrouve en amont de mTORC1 (Tee, Manning et al. 2003). En condition physiologique, l'hétérodimère TSC1/ 2 est constitutivement actif,

hydrolysant constamment le groupement GTP en GDP. Lorsqu'il y a intégration d'un signal, une protéine kinase phosphoryle l'hétérodimère TSC1/2, induisant ainsi une diminution de son activité. Cela engendre une augmentation de la quantité de Rheb-GTP et permet son interaction avec mTORC1 (Inoki, Li et al. 2003). Cette interaction stimule grandement l'activité kinase de mTORC1, lui permettant ainsi d'interagir avec ses substrats (Saxton and Sabatini 2017).

Selon le type cellulaire et la condition physiologique, la voie de signalisation de mTORC1 peut aussi être modulée indépendamment de TSC1/2. Les principaux acteurs impliqués dans ce processus sont les protéines Akt et PKA ainsi que les acides aminés. D'une part, les protéines Akt et PKA peuvent phosphoryler PRAS40 et limiter l'interaction de cette protéine avec Raptor. En n'interagissant plus avec Raptor, PRAS40 se retrouve dissocié de mTORC1, permettant ainsi son activation (Wiza, Nascimento et al. 2012, Volkers and Sussman 2013). À la fin des années 90 et au début des années 2000, différents groupes ont démontré, *in vitro*, que la concentration intracellulaire de l'acide aminé leucine pouvait moduler l'activité de mTORC1 (Christie, Hajduch et al. 2002, Beugnet, Tee et al. 2003). De plus, tel que décrit par Goberdhan et ses collaborateurs, de récentes études montrent que mTORC1 est aussi sensible à la concentration d'autres acides aminés comme la sérine, l'arginine et la glutamine (Goberdhan, Wilson et al. 2016). Depuis 2008, plusieurs groupes ont œuvré à mieux définir le mécanisme sous-jacent à l'activation de mTORC1 par ces acides aminés. Le modèle actuel propose qu'en concentration intracellulaire suffisante d'acides aminés, il y a formation et activation d'un complexe *Ras-related guanosine triphosphate (GTP)-binding* (Rag). Cela permet la formation de mTORC1 à la membrane lysosomale et son activation par l'entremise d'une étroite interaction avec Rheb. Enfin, de récentes études suggèrent de nouveaux mécanismes signalétiques, dont un mécanisme dépendant des V-ATPase et un autre mécanisme nécessitant la participation des complexes composés de GATOR1 et GATOR2 (Nguyen, Frank et al. 2017, Wolfson and Sabatini 2017, Kim and Guan 2019).

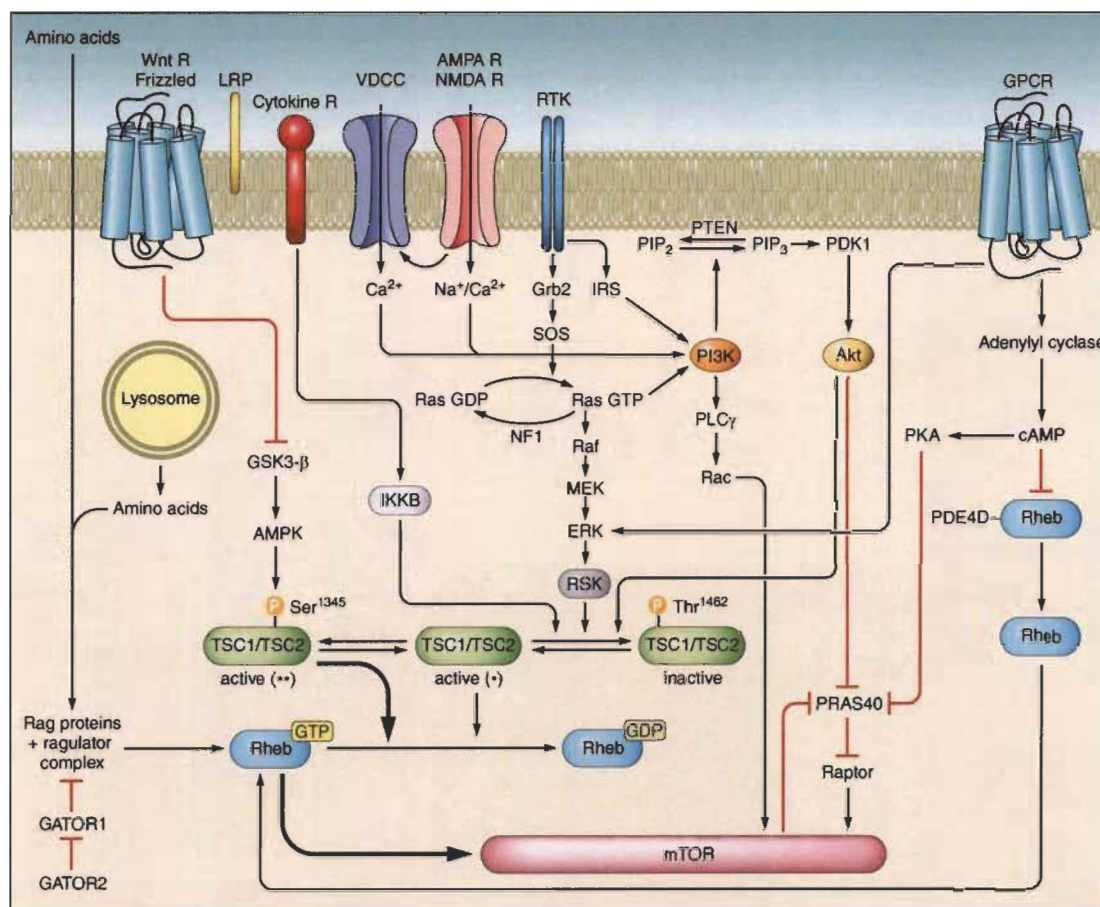


Figure 1.7 Schématisation de la régulation de mTORC1.

Plusieurs voies de signalisation convergent et inactivent le complexe TSC1/2. L'inactivation du complexe TSC1/2 provoque l'augmentation de Rheb-GTP, ce qui induit l'activation de mTORC1. Aussi, l'activation de Rheb par les acides aminés ainsi que l'inhibition de PRAS40 par Akt ou PKA activent mTORC1 sans l'intervention du complexe TSC1/2. TSC1/2, *tuberous sclerosis proteins 1 and 2*; Rheb, *Ras homolog enriched in brain*; PRAS40, *proline-rich Akt/PKB substrate 40 kDa*. (Tirée et adaptée de (Bockaert and Marin 2015).)

Les principaux substrats de mTORC1 sont les protéines S6K1/2 et *eIF4E-binding proteins 1 and 2* (4E-BP1/2). Les protéines S6K1 et S6K2 sont des sérines/thréonines kinases encodées par différents gènes et elles partagent une forte homologie structurale (Fenton and Gout 2011). Les protéines 4E-BP1 et 4E-BP2, découvertes en 1994, partagent 56 % d'homologie (Pause, Belsham et al. 1994). Enfin, les substrats S6K1/2 et 4E-BP1/2 sont directement liés à la fonction la plus connue et étudiée de mTORC1, soit la synthèse de nouvelles protéines. En effet, il est démontré que l'activation de S6K1/2 par mTORC1

mène à la phosphorylation de la *Ribosomal subunit protein S6* (rpS6), une composante de la sous-unité 40S du ribosome qui régule la traduction (Ma and Blenis 2009). Les protéines 4E-BP1/2 lient la protéine *Eukaryotic translation initiation factor 4* (eIF4E). Cette protéine est essentielle à la formation d'un complexe qui permet le recrutement du ribosome au brin d'ARNm. Lorsque les protéines 4E-BP1/2 sont phosphorylées par mTORC1, cela engendre la dissociation entre 4E-BP1/2 et eIF4E, permettant ainsi l'initiation de la traduction de nouvelles protéines (Richter and Sonenberg 2005, Martineau, Muller et al. 2014).

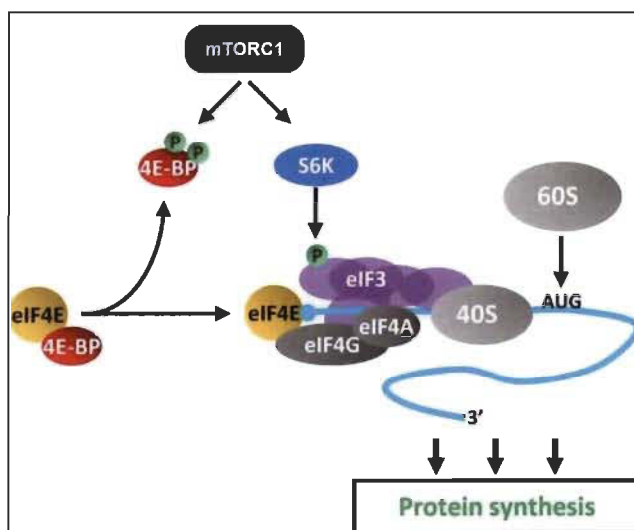


Figure 1.8 Schématisation simplifiée de l'interaction entre mTORC1 et ses deux principaux substrats, S6K et 4E-BP.

La phosphorylation de S6K1/2 et 4E-BP1/2 par mTORC1 stimule la synthèse de nouvelles protéines. S6K1/2, *Ribosomal protein S6 kinases 1 and 2*; 4E-BP1/2, *eIF4E-binding proteins 1 and 2*. (Tirée et adaptée de (Martineau, Muller et al. 2014).)

CHAPITRE II

LA MÉMOIRE, LES ÉMOTIONS ET LA MOTRICITÉ

2.1 La mémoire : historique

L'apprentissage est un processus qui se définit comme la capacité d'acquérir de nouvelles connaissances et par conséquent, d'adopter de nouveaux comportements. Cette fonction cognitive de haute importance est indissociable d'un autre processus, la mémoire. La mémoire est la faculté d'encodage, de stockage et de récupération des diverses formes d'apprentissage. Les bases anatomiques de la mémoire à long terme ont été jetées au milieu des années 1950. En effet, les premières évidences de la participation de régions cérébrales précises à la formation d'une mémoire à long terme proviennent de l'étude du patient H.M. À l'âge de 7 ans, le patient H.M subit de graves dommages cérébraux à la suite d'un accident de vélo. La résultante de cet accident est qu'à l'âge de 27 ans, le patient H.M souffrait depuis déjà 10 ans de graves crises épileptiques issues du lobe temporal. Malheureusement pour lui, les crises étaient intraitables. Puisqu'il ne pouvait pas travailler et vivre une vie normale, le chirurgien William Scoville décide de traiter le patient H.M en effectuant une ablation chirurgicale de l'hippocampe, l'amygdale ainsi que certaines structures provenant du lobe temporal. À la suite de cette intervention chirurgicale, les crises épileptiques du patient H.M étaient fortement diminuées et mieux contrôlées. Toutefois, il n'était plus apte à mémoriser de nouvelles informations déclaratives sur une longue période de temps. Ainsi, ce cas clinique historique a permis de créer un lien entre la mémoire à long terme et diverses structures du lobe temporal (Purves 2018).

2.1.1 Hippocampe : structure anatomique et circuit trisynaptique

L'hippocampe est l'une des régions cérébrales qui est névralgique à la formation, au stockage ainsi qu'à la récupération de différents types de mémoire. Situé dans la partie

interne et médiane des lobes temporaux, l'hippocampe est une structure corticale, bilatérale et symétrique. Elle fait partie intégrante de la formation hippocampique qui comprend aussi le cortex entorhinal, le parasubiculum, le presubiculum, le subiculum et le gyrus dentelé. Communément nommé la corne d'Ammon dû à son apparence en forme de corne de bœuf, l'hippocampe est divisé en trois régions anatomiques et morphologiques distinctes : CA1, CA2 et CA3. Le principal circuit excitateur de l'hippocampe est le circuit neuronal trisynaptique. Ce circuit se divise en trois voies précises : la première voie, connue sous le nom de voie perforante, est composée des cellules pyramidales du cortex entorhinal. Ces cellules projettent vers le gyrus dentelé et communiquent avec les cellules granuleuses. La deuxième voie, la voie des fibres moussues, est constituée des axones des cellules granuleuses qui entrent en contact avec les dendrites des cellules pyramidales de la région CA3. Finalement, l'information excitatrice est transmise de la région CA3 aux neurones pyramidaux de la région CA1 par les collatérales de Schaffer (Purves 2018).

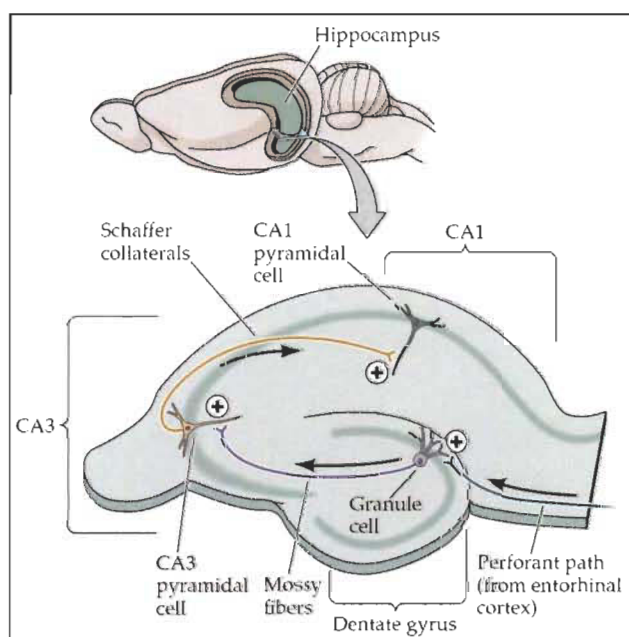


Figure 2.1 Circuit trisynaptique de l'hippocampe.

À l'hippocampe, les neurones de la voie perforante stimulent les cellules granuleuses du gyrus dentelé. Ces neurones stimulent les cellules pyramidales de la région CA3. L'information excitatrice est finalement acheminée aux neurones pyramidaux de la région CA1. (Tirée de (Purves 2018).)

2.1.2 La plasticité synaptique

À la fin des années 1960, il existait encore un grand mystère en ce qui concerne la mémoire. En effet, il était reconnu que différentes formes de mémoire existaient, mais les processus cellulaires et moléculaires permettant la formation, l'encodage ainsi que le stockage de la mémoire étaient encore nébuleux. Les neurones peuvent communiquer par l'intermédiaire d'une synapse chimique. Lorsqu'un neurone présynaptique est stimulé, il libère un neurotransmetteur dans la fente synaptique. Le neurotransmetteur agira sur son récepteur cible au niveau postsynaptique et cela aura pour effet de moduler (accentuer ou diminuer) l'excitabilité neuronale. À début des années 70, plusieurs groupes de recherche ont tenté d'élucider les mécanismes de transmission synaptique afin de mieux définir les bases biologiques de la mémoire. Les résultats issus de ces nombreuses recherches ont permis de constater que les connexions synaptiques sont dynamiques; ce concept, dénommé plasticité synaptique, se caractérise comme étant la capacité des neurones à modifier de manière bidirectionnelle l'efficacité de leur transmission synaptique en fonction des stimulations environnementales (Purves 2018). D'une part, des expériences réalisées par Kandel et ses collègues chez l'aplasie, jumelées aux résultats d'autres laboratoires, ont permis de définir des formes de plasticité synaptique à court terme comme la facilitation, la dépression et l'augmentation. Ces formes de plasticité synaptique à court terme modifient la transmission pendant un intervalle de temps inférieur à quelques minutes (Kandel, Dudai et al. 2014). En parallèle, les chercheurs Timothy Bliss et Terje Lomo sont les premiers à avoir mis en évidence la première forme de plasticité synaptique à long terme. En effet, en appliquant pendant quelques secondes une stimulation électrique à haute fréquence (*theta burst*) sur un faisceau de fibres précises de l'hippocampe d'un lapin, ils ont observé une augmentation de la neurotransmission entre les fibres stimulées et la région postsynaptique des neurones. De plus, cette augmentation de la neurotransmission perdurait dans le temps (Bliss and Lomo 1973). De ces expériences sont nés les premiers jets de ce que nous appelons maintenant la potentialisation à long terme (LTP). Aujourd'hui, nous savons qu'il existe aussi une autre forme de plasticité à long terme qui se nomme la dépression à long terme (LTD). En somme, la LTP est le processus qui comprend l'ensemble des mécanismes cellulaires et moléculaires permettant le renforcement de la synapse et l'augmentation de la transmission synaptique sur une longue

période de temps. À l'inverse, la LTD est le processus qui inclut la totalité des mécanismes cellulaires et moléculaires qui engendre une réduction de la transmission synaptique sur une longue période de temps (Bliss and Cooke 2011, Ho, Lee et al. 2011, Peters, Reisch et al. 2018).

2.1.3 Mécanismes moléculaires de la LTP à l'hippocampe

La majorité des études qui examinent les processus cellulaires de la mémoire liée à l'hippocampe se concentre principalement sur la LTP produite dans la région CA1. La LTP produite dans la région CA1 présente trois caractéristiques intéressantes : (1) une coopérativité, (2) une associativité et (3) une spécificité. La coopérativité signifie que plusieurs neurones sont nécessaires à la réalisation de la LTP. L'associativité stipule que les neurones présynaptiques et postsynaptiques interagissent ensemble. Finalement, la spécificité se caractérise par un signal enregistré qui est exclusif aux collatérales de Schaeffer (Purves 2018).

Même si les premières études sur la LTP ont été réalisées au début des années 70, ce n'est qu'à la fin des années 80 que des études ont commencé à démystifier le mécanisme cellulaire expliquant ce phénomène (Bliss and Collingridge 1993, Malenka and Nicoll 1993). De façon générale, il est accepté par la communauté scientifique que la LTP induite au niveau de l'hippocampe nécessite la participation du glutamate, des récepteurs ionotropes α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazole-4-propionate (AMPA) et N-méthyl-D-aspartate (NMDA). Les propriétés excitatrices du glutamate sont connues depuis les années 1950 (Hayashi 1952). Toutefois, ce n'est qu'à la fin des années 1970 qu'il a été fortement véhiculé par la communauté scientifique que le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur du cerveau chez les vertébrés. Quelque temps après, il a été découvert que le glutamate agit sur les récepteurs ionotropes NMDA, AMPA et kaïnate de la région postsynaptique. Ces récepteurs, incorporés à des canaux ioniques, permettent le passage de divers cations, dont le Ca^{2+} et le Na^+ . Vers la fin des années 1980, il a été proposé que le glutamate pouvait aussi lier et activer des récepteurs métabotropes. Contrairement aux récepteurs ionotropes, les récepteurs métabotropes sont liés aux

protéines G. L'activation de ces récepteurs entraîne la dissociation de la protéine G qui ira soit moduler de seconds messagers, soit agir sur des canaux ioniques (Malenka and Nicoll 1993).

Les récepteurs AMPA sont des récepteurs ionotropes assemblés dans le réticulum endoplasmique sous forme de dimères (Vanhaesebroeck, Guillermet-Guibert et al. 2010). Ces dimères vont s'associer et formeront ensuite des tétramères (Tichelaar, Safferling et al. 2004). Ces tétramères sont composés de sous-unités nommées GluR1, GluR2, GluR3 et GluR4. Chez le rongeur adulte, les combinaisons de sous-unités sont principalement formées de GluR1 et GluR2 ou de GluR2 et GluR3. Ces combinaisons de sous-unité sont les plus courantes au niveau des synapses excitatrices de l'hippocampe (Wenthold, Petralia et al. 1996, Lu, Shi et al. 2009). La liaison du glutamate aux diverses sous-unités permet l'ouverture croissante des récepteurs AMPA. Plus la concentration en glutamate est forte dans la fente synaptique, plus il y a de liaisons de ce neurotransmetteur aux récepteurs AMPA. Cela mène à l'ouverture complète des récepteurs et l'entrée d'ions sodium (Na^+) dans le neurone postsynaptique (Bredt and Nicoll 2003).

Les récepteurs NMDA sont des canaux ioniques voltage-dépendants. Il s'agit d'hétérodimères formés de l'association variable des sous-unités NR1, NR2 et NR3. Il existe huit sous-unités NR1, quatre sous-unités NR2 et deux sous-unités NR3. Un récepteur NMDA fonctionnel est constitué d'au moins une sous-unité NR1 associée à une sous-unité NR2. Généralement, les récepteurs NMDA sont composés de deux sous-unités NR1 et NR2. Les propriétés électrophysiologiques des récepteurs NDMA sont médiées par la sous-unité NR2 (Paoletti and Neyton 2007, Glasgow, Siegler Retchless et al. 2014). Le glutamate et la glycine doivent conjointement se lier aux récepteurs NMDA afin de les activer complètement (Johnson and Ascher 1987, Lerma, Zukin et al. 1990). Par ailleurs, le passage d'ions calcium (Ca^{2+}) s'effectue exclusivement lorsque l'ion magnésium (Mg^{2+}), qui bloque le canal au repos, est délogé à la suite d'une dépolarisation membranaire (Mayer, Westbrook et al. 1984, Dingledine, Borges et al. 1999).

Lors de l'application de plusieurs stimulations à haute fréquence, le neurone présynaptique libère du glutamate qui se lie aux récepteurs AMPA et NMDA localisés à la membrane du neurone postsynaptique. Cette liaison permet l'ouverture des récepteurs AMPA, l'entrée d'ion sodium (Na^+) dans le neurone postsynaptique et la dépolarisation graduelle de la membrane plasmique. Lorsque la dépolarisation membranaire atteint un certain seuil, l'ion Mg^{2+} est expulsé des récepteurs NMDA afin de permettre l'ouverture complète. Cette ouverture occasionne l'entrée massive de Ca^{2+} dans le neurone. Dans les premières heures suivant l'application de plusieurs stimulations à haute fréquence, aussi nommée la phase précoce de la potentialisation à long terme (E-LTP), l'internalisation importante de Ca^{2+} induit l'activation de plusieurs seconds messagers. Ceux-ci permettent l'incorporation et la redistribution de récepteurs AMPA à la synapse. Dans la potentialisation à long terme tardive (L-LTP), qui se manifeste plusieurs heures et jours suivant les stimulations à haute fréquence, la haute concentration en Ca^{2+} intracellulaire promeut l'activation de kinases, de phosphatases et de protéases. Ces protéines nouvellement activées permettront la transcription de gènes et la traduction de protéines. Les nouvelles protéines synthétisées participeront au remodelage structural de la synapse. L'ensemble de ces changements accentue la force de la transmission synaptique (Lamprecht and LeDoux 2004, Bliss and Cooke 2011, Ho, Lee et al. 2011, Kandel, Dudai et al. 2014).

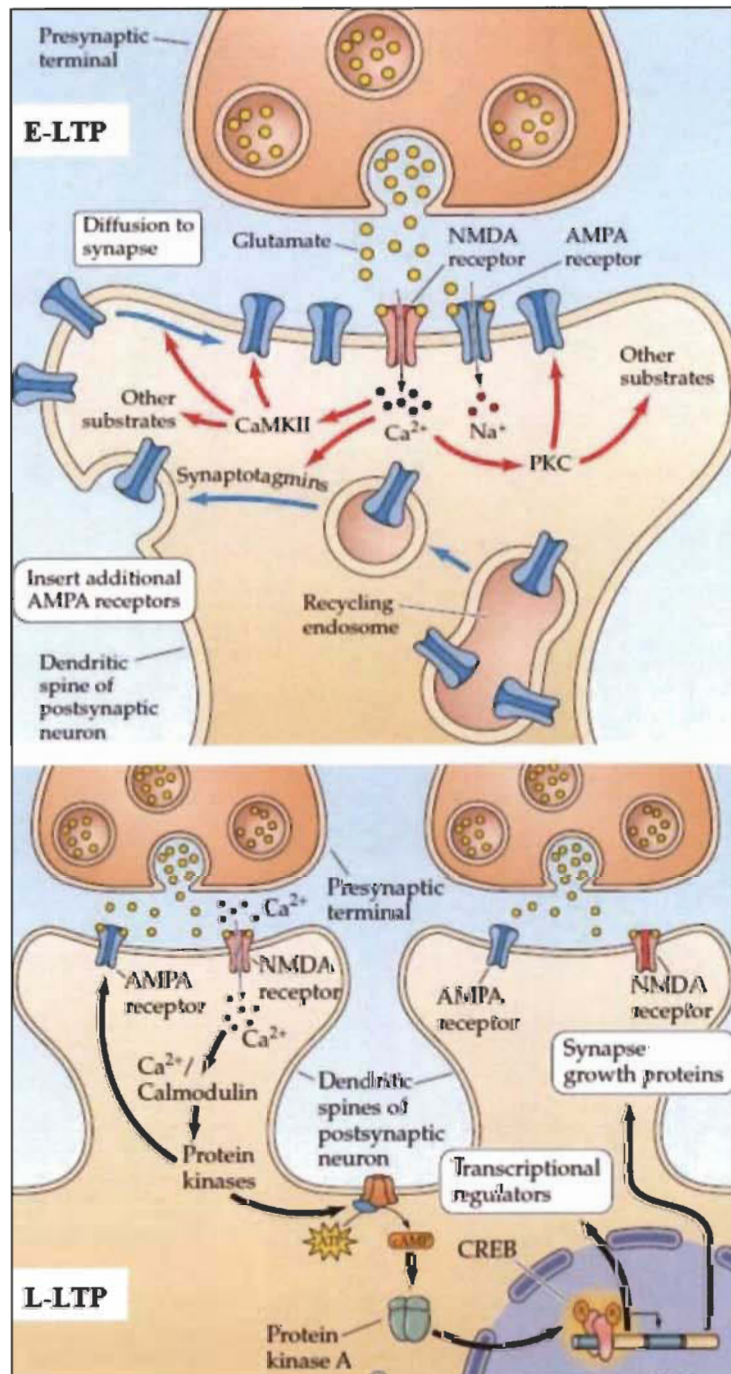


Figure 2.2 Mécanisme de la LTP à l'hippocampe.

Dans la E-LTP, l'internalisation intracellulaire de Ca^{2+} induite par l'ouverture des récepteurs ionotropes NMDA stimule l'insertion et le mouvement des récepteurs AMPA à la synapse. Dans la L-LTP, l'internalisation intracellulaire de Ca^{2+} induite par l'ouverture des récepteurs ionotropes NMDA active des protéines kinases et des facteurs de transcriptions. De nouveaux gènes seront transcrits, de nouvelles protéines seront traduites et une nouvelle synapse se formera. (Tirée de (Purves 2018).)

2.1.4 Les protéines Akt-GSK3-mTOR : mémoire et plasticité synaptique

La première étude suggérant l'implication de la protéine Akt à la plasticité synaptique a été réalisée par Wang et ses collaborateurs. Dans cette étude *in vitro*, les auteurs proposèrent que la protéine Akt régule le nombre de récepteurs GABAergiques à la région postsynaptique et par le fait même, module le renforcement de la synapse (Wang, Liu et al. 2003). À la suite de cette étude, une autre a souligné la participation de la protéine Akt à la plasticité synaptique chez la drosophile. En effet, les auteurs de cette étude démontrèrent que l'expression d'une version mutante de cette protéine dans la jonction neuromusculaire réduisait considérablement la LTD. De plus, ils montrèrent que cette réduction de la LTD pouvait être récupérée par l'injection de la protéine Akt non mutée (Guo and Zhong 2006). L'implication d'Akt à la plasticité synaptique a aussi été relevée chez la souris et le rat. En effet, une étude réalisée chez la souris a montré que l'activation de la protéine Akt est nécessaire à la modulation de la LTD induite par les récepteurs mGluR. De plus, l'inhibition pharmacologique de l'activité d'Akt diminue la LTD (Hou and Klann 2004). La protéine Akt est aussi associée à la LTP dans différentes structures du cerveau. D'une part, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques qui diminuent l'activité d'Akt, tels que la worthmannin et le LY294002, altère l'induction de la LTP au niveau du cortex préfrontal chez le rat (Sui, Wang et al. 2008). D'une autre part, la diminution substantielle de l'activité d'Akt, induite par l'abolition de mTORC2 au niveau de l'hippocampe, diminue la LTP (Huang, Zhu et al. 2013). Au niveau comportemental, il a été relevé que la protéine Akt participe à la mémorisation de différents apprentissages, dont la mémoire spatiale ainsi que le conditionnement de la peur (Sui, Wang et al. 2008, Balu, Carlson et al. 2012, Huang, Zhu et al. 2013). Malgré ces évidences de la littérature, soulignant l'implication de l'activité d'Akt aux processus de plasticité synaptique et à la mémoire, le rôle précis d'Akt3 au sein de ces processus n'est toujours pas connu.

Plusieurs études ont aussi démontré l'implication de GSK3, préférentiellement l'isoforme β aux mécanismes de plasticité synaptique. D'une part, il a été montré que l'induction de la LTP au niveau du gyrus denté et de la région CA1 de l'hippocampe

inhibe l'activité de GSK3 β (Peineau, Taghibiglou et al. 2007). Dans le même ordre d'idée, une forte diminution de la LTP et des troubles comportementaux liés à la mémoire ont été observés chez des souris surexprimant GSK3 β . En inhibant l'activité de GSK3 β à l'aide de composés pharmacologiques, il a été possible de corriger ces anomalies comportementales et d'obtenir une LTP équivalente aux souris de phénotype sauvage (Hooper, Markevich et al. 2007). À l'inverse, il a été démontré que la LTD accentue le niveau d'activité de GSK3 et que l'inhibition pharmacologique de GSK3 prévient l'induction de la LTD modulée par les récepteurs NMDA (Peineau, Taghibiglou et al. 2007). Aussi, il est intéressant de noter que chez certains modèles d'animaux, dont des souris modèles du syndrome de Down et du syndrome du X fragile, l'inhibition de GSK3 améliore les anomalies cognitives et corrige des processus de plasticité synaptique (Yuskaitis, Mines et al. 2010, Contestabile, Greco et al. 2013, King and Jope 2013). Au-delà de ces études qui visent préférentiellement GSK3, d'autres investigations soulignent que les substrats de GSK3 sont aussi liés à la formation d'une mémoire durable. À titre d'exemple, GSK3 peut moduler la protéine *cAMP responsive element-binding protein* (CREB) (Sutherland 2011). La protéine CREB est fortement reconnue pour jouer un rôle clé dans les processus de plasticité synaptique et dans la formation de la mémoire (Silva, Kogan et al. 1998, Kandel 2012). Malgré ces évidences de la littérature, il n'est pas connu s'il existe un lien entre Akt3 et GSK3 à la formation de la mémoire et aux mécanismes de plasticité synaptique.

Les premières évidences liant la signalisation de mTORC1 et la plasticité synaptique sont issues d'expériences qui illustraient que l'administration de rapamycine chez l'aplysie et l'écrevisse bloquait la facilitation à long terme, une forme de LTP chez les invertébrés (Beaumont, Zhong et al. 2001, Carroll, Warren et al. 2004). À la suite de ces expériences, plusieurs groupes de recherches ont continué d'étudier le potentiel rôle de mTOR dans la plasticité synaptique, mais cette fois-ci, en utilisant des souris dans un contexte *ex vivo*. Tout d'abord, Tang et Schuman ont démontré que l'application de rapamycine sur des tranches d'hippocampe de rat bloquait la L-LTP induite par les récepteurs NMDA. De plus, ces auteurs ont démontré que les protéines mTOR, eIF4E et 4EBP colocalisent avec des marqueurs postsynaptiques (Tang, Reis et al. 2002).

Enfin, une étude montre que la LTP induite par des stimulations électriques sur des tranches d'hippocampe de rat augmente l'activité de mTORC1 et l'expression de EF1A, protéine importante à la traduction de nouvelles protéines (Tsokas, Grace et al. 2005). Lorsque ces tranches d'hippocampe de rat furent traitées avec de la rapamycine, les auteurs ont remarqué que la LTP était fortement altérée et que l'expression de EF1A était drastiquement réduite. De ce fait, ils ont suggéré que la signalisation de mTORC1, qui favorise la production de nouvelles protéines, était particulièrement importante au maintien de la LTP (Tsokas, Grace et al. 2005).

Des études subséquentes, effectuées sur les protéines S6K1/2 et 4EBP, ont permis de clarifier le rôle de la signalisation de mTORC1 dans divers processus de plasticité synaptique liés à l'hippocampe. Tout d'abord, une étude démontre que la délétion génétique de S6K1 ou S6K2 n'a pas d'impact sur l'induction de la L-LTP liée à l'hippocampe. Toutefois, les auteurs montrent que la délétion de S6K1 cause une diminution de la E-LTP (Antion, Merhav et al. 2008). Inversement, la délétion de 4EBP2 chez la souris empêche l'induction de la LTP au niveau de l'hippocampe. Aussi, les auteurs de ces études démontrent que la délétion de 4EBP2 induit des anomalies comportementales, dont une détérioration de la mémoire spatiale ainsi que de la mémoire associée au conditionnement de la peur (Banko, Poulin et al. 2005, Banko, Merhav et al. 2007). Une étude réalisée par Bekinschtein et ses collaborateurs montre que l'entraînement de rat à éviter un stimulus douloureux module l'activité de mTORC1 et la phosphorylation de son substrat p70S6K au niveau de l'hippocampe (Bekinschtein, Kathe et al. 2007). Les auteurs ont ensuite validé l'importance de l'activité de mTORC1 en injectant de la rapamycine directement dans l'hippocampe avant l'entraînement des rats à éviter le stimulus douloureux. Les résultats issus de ces expériences révèlent que l'inhibition de l'activité de mTORC1 altère la mémoire à long terme dans ce paradigme d'entraînement (Bekinschtein, Kathe et al. 2007). Dans le même ordre d'idée, une autre étude a démontré que l'entraînement du conditionnement par la peur augmente la phosphorylation du substrat S6K1/2. De plus, cette étude illustre que l'inhibition de l'activité de mTORC1 par l'injection de rapamycine au niveau de l'hippocampe altère la formation de la mémoire à long terme dans ce contexte (Gafford, Parsons et al. 2011).

Au niveau de l'hippocampe de souris, il a aussi été démontré que l'injection systémique de rapamycine n'altère pas la capacité à apprendre dans le labyrinthe multiple en T (Deli, Schipany et al. 2012). En revanche, l'inhibition de mTORC1 altère la consolidation à long terme de cet apprentissage. Ces résultats comportementaux corrélerent avec la diminution de l'activation de rpS6 (Deli, Schipany et al. 2012). De manière intéressante, la signalisation de mTORC1 semble essentielle à l'apprentissage et la formation d'une mémoire durable dans d'autres structures cérébrales que l'hippocampe. Deux études indépendantes montrent que l'inhibition de mTORC1 au niveau de l'amygdale, une structure cérébrale liée aux émotions, altère le processus de mémorisation dans des paradigmes expérimentaux liés au conditionnement par la peur (Glover, Ressler et al. 2010, Jobim, Pedroso et al. 2012). Des résultats similaires sont observés au niveau du cortex auditif et gustatif, où l'inhibition de mTORC1 altère différentes formes de mémoire liées à ces structures (Tischmeyer, Schicknick et al. 2003, Belevsky, Kaphzan et al. 2009). L'ensemble de ses études tend à démontrer que la protéine mTOR, plus spécifiquement la signalisation de mTORC1, est importante aux processus de plasticité synaptique et à la formation d'une mémoire durable dans plusieurs structures cérébrales.

2.2 Les émotions

Les émotions sont essentielles à la survie. Elles permettent l'adaptation à un stimulus externe en se manifestant par l'expression d'une réponse psychologique, cognitive et comportementale. Chez l'humain, les émotions sont intrinsèquement associées à l'humeur, le tempérament, aux traits de personnalité ainsi qu'à la motivation. Il existe une multitude d'émotions et de manière générale, elles sont divisées en deux grands groupes : les émotions positives et les émotions négatives. Les émotions positives sont éveillées par des stimuli que se rapportent au confort, à la sécurité ou à une situation d'opportunité reproductive. Les émotions négatives, comme la peur, apparaissent lorsqu'un stimulus externe évoque le danger, la douleur, le retrait ou la fuite. Encore aujourd'hui, il n'est pas encore clairement défini quelles structures cérébrales régissent une émotion donnée. Toutefois, il est connu que la régulation et l'expression des émotions impliquent, en partie, de structures cérébrales comme

l'amygdale, l'hippocampe, le gyrus parahippocampique et le gyrus cingulaire. Ces structures forment de fortes connexions avec l'hypothalamus, le noyau accumbens et le cortex préfrontal (Nestler, Hyman et al. 2009).

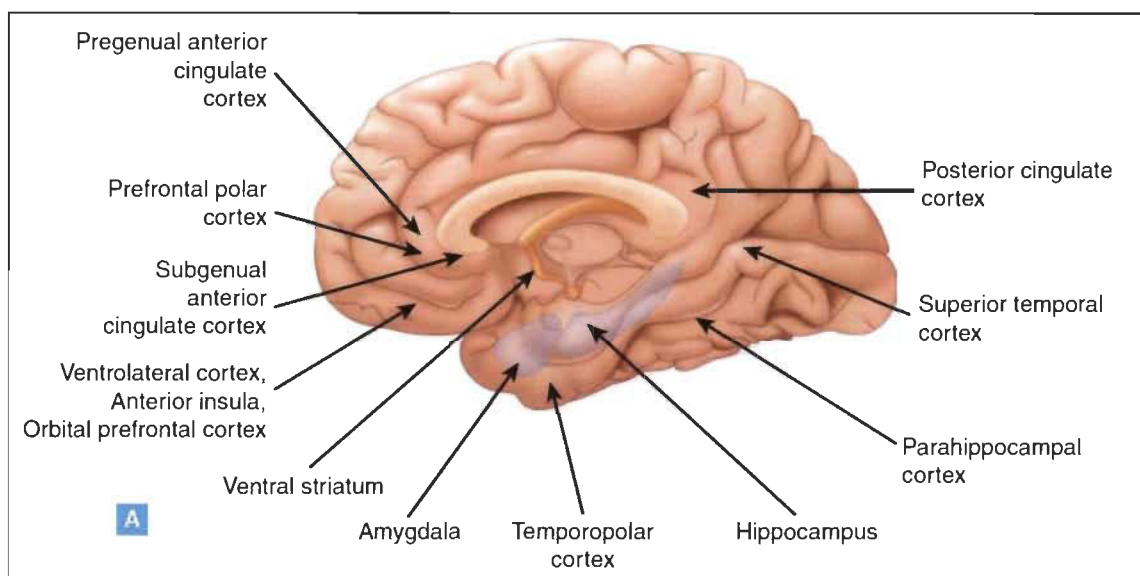


Figure 2.3 Principales structures impliquées dans les émotions et l'humeur. (Tirée de (Nestler, Hyman et al. 2009)).

Plusieurs maladies humaines auront pour effet de produire un état émotionnel pathologique. Pour le bénéfice de cette thèse, la schizophrénie et les troubles de l'humeur, deux troubles psychiatriques intimement liés aux émotions, seront décrits en détail dans les prochaines sections. D'abord, afin de bien comprendre les hypothèses et l'étiologie de ces maladies, il est névralgique d'introduire les neurotransmetteurs monoaminergiques. Leurs actions en condition physiologique sont fortement associées à la régulation des émotions et une altération dans leur fonctionnement est intimement liée aux maladies psychiatriques présentées dans cette thèse.

2.2.1 Les neurotransmetteurs monoaminergiques

Il y a plus de 100 neurotransmetteurs différents et chacun exerce une diversité époustouflante d'effets d'un point de vue cellulaire, moléculaire et comportemental.

Ces messagers chimiques peuvent être classifiés en fonction de leur identité moléculaire : petite molécule organique, peptide, monoamine, nucléotide et acides aminés (Kandel, Schwartz et al. 2013). Pour l'intérêt de cette thèse, seulement les quatre neurotransmetteurs monoaminergiques suivants seront décrits : la dopamine, la noradrénaline, l'adrénaline et la sérotonine.

Parmi ces neurotransmetteurs, la dopamine, la noradrénaline et l'adrénaline sont issues de la même famille, soit les catécholamines. D'une part, la dopamine a été découverte dans les années 50 par le Dr Arvid Carlsson et ses collaborateurs. Elle est principalement synthétisée au niveau de l'aire tegmentale ventrale (VTA) et au niveau de la substance noire *pars compacta* (SNc), deux structures du mésencéphale. Les neurones dopaminergiques du VTA forment deux voies : la voie mésolimbique et mésocorticale. La voie mésolimbique est constituée des neurones dopaminergiques du VTA qui projettent vers des structures du système limbique, dont le noyau accumbens, l'amygdale et le cortex cingulaire. Cette voie est importante dans la régulation de la motivation et dans la modulation des comportements associés aux dépendances et au plaisir. La voie mésocorticale se caractérise par les neurones dopaminergiques du VTA qui projettent vers le cortex préfrontal. Cette voie est impliquée dans des processus cognitifs, dont la mémoire de travail. Enfin, les neurones dopaminergiques de la SNc projettent vers le striatum (noyau caudé et putamen) pour former la voie nigro-striée. Cette voie est intimement associée aux processus de motricité (Beaulieu and Gainetdinov 2011, Klein, Battagello et al. 2019, Solinas, Belujon et al. 2019). En ce qui concerne la noradrénaline, ce neurotransmetteur est essentiellement synthétisé au niveau du locus coeruleus, une structure située dans le pont du tronc cérébral. À partir du locus coeruleus, les neurones noradrénergiques projettent à différents endroits, dont le cortex cérébral, le thalamus, l'hippocampe, l'amygdale, le cervelet et la moelle épinière. La noradrénaline régule une variété de fonctions critiques, dont l'éveil, l'attention, la réaction au stress ainsi que la mémoire (Benarroch 2009, O'Donnell, Zeppenfeld et al. 2012). Enfin, comparativement à la dopamine et la noradrénaline, l'adrénaline est retrouvée en faible concentration au cerveau. Les principaux neurones du système nerveux central synthétisant l'adrénaline se retrouvent dans la moelle allongée, soit la partie inférieure du

tronc cérébral. Ces neurones projettent vers l'hypothalamus et le thalamus, permettant ainsi la régulation de la respiration et des fonctions cardiaques (Purves 2018). Finalement, au niveau du système nerveux central, la majorité des neurones productrices de sérotonine est localisée dans les noyaux de raphé du tronc cérébral. À partir de cet endroit, les neurones sérotoninergiques projettent sur presque toutes les régions du cerveau, le cervelet et la moelle épinière (Berger, Gray et al. 2009, Purves 2018). Chez l'humain, une quantité titanesque de rôles, autant au niveau du système nerveux central qu'en périphérie, est attribuée à la sérotonine. À titre d'exemple, la sérotonine serait impliquée dans la régulation : de l'humeur, de la motricité, des comportements sexuels, de l'appétit, des mécanismes associés à la récompense, de la mémoire, de la respiration et du rythme circadien (O'Mahony, Clarke et al. 2015). À vrai dire, tel que décrit par Berger et ses collaborateurs (Berger, Gray et al. 2009), il est difficile de trouver un comportement chez l'humain qui n'est pas influencé ou modulé par la sérotonine.

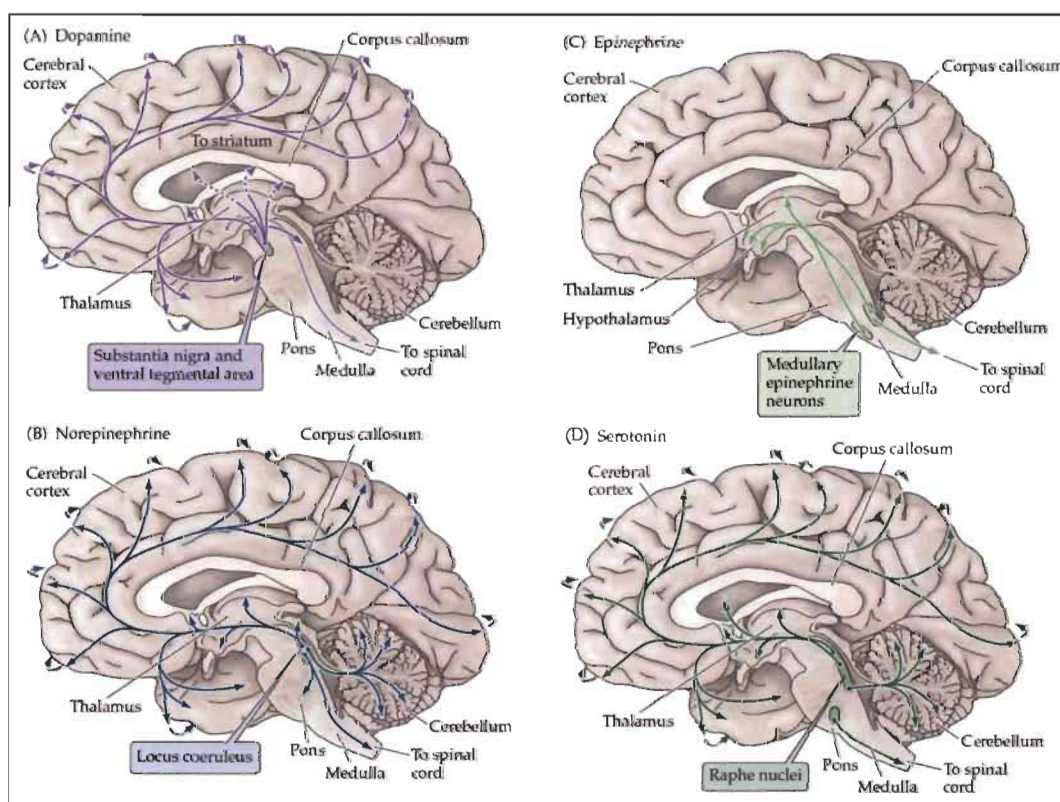


Figure 2.4 Les voies dopaminergique, noradrénergique, adrénérergique et sérotoninergique au cerveau. (Tirée et adaptée de (Purves 2018).)

Le métabolisme de la dopamine, de la noradrénaline et de l'adrénaline dérive du même précurseur commun, soit l'acide aminé essentiel tyrosine. Leur synthèse débute par la transformation de la tyrosine en L-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) par l'entremise de la tyrosine hydroxylase. La L-DOPA subit ensuite une décarboxylation par la DOPA-décarboxylase (DDC), ce qui mène à la formation de dopamine. La dopamine, nouvellement synthétisée, est emmagasinée dans des vésicules synaptiques sous l'action des transporteurs vésiculaire des monoamines (VMAT). Une fois à l'intérieur de la vésicule synaptique, la dopamine est convertie en noradrénaline grâce à l'enzyme β -hydroxylase. Dans les neurones producteurs d'adrénaline, la méthylation de la noradrénaline par la phényléthylamine-*N*-méthyltransférase produit l'adrénaline. Dans la fente synaptique, la dopamine et la noradrénaline sont récupérées au niveau présynaptique ou par les cellules gliales voisines à l'aide de transporteurs à la dopamine (DAT) ou par l'entremise de transporteurs à la noradrénaline (NET). Ces neurotransmetteurs peuvent aussi être dégradés par l'action des monoamines oxydases et la cathéchol-O-méthyltransférase (COMT) (Purves 2018).

À l'instar des catécholamines, la sérotonine (aussi nommée 5-hydroxytryptamine ou 5-HT) est aussi synthétisée à partir d'un acide aminé essentiel. Les neurones sérotoninergiques captent l'acide aminé tryptophane du milieu extracellulaire à l'aide d'un transporteur membranaire. Par la suite, le tryptophane internalisé est hydroxylé en 5-hydroxytryptophane sous l'action de l'enzyme tryptophane hydroxylase. Finalement, l'enzyme 5-hydroxytryptophane décarboxylase convertit le 5-hydroxytryptophane en 5-hydroxytryptamine (sérotonine). Une fois synthétisée, la sérotonine est emmagasinée dans des vésicules synaptiques sous l'influence de VMAT. Lorsque la sérotonine se retrouve dans la fente synaptique, elle est récupérée au niveau présynaptique par des transporteurs sélectifs à la sérotonine (SERT). Dans les neurones sérotoninergiques, la sérotonine recapturée est emmagasinée à nouveau dans les vésicules synaptiques ou inactivée par les MAO (Pithadia and Jain 2009, Purves 2018).

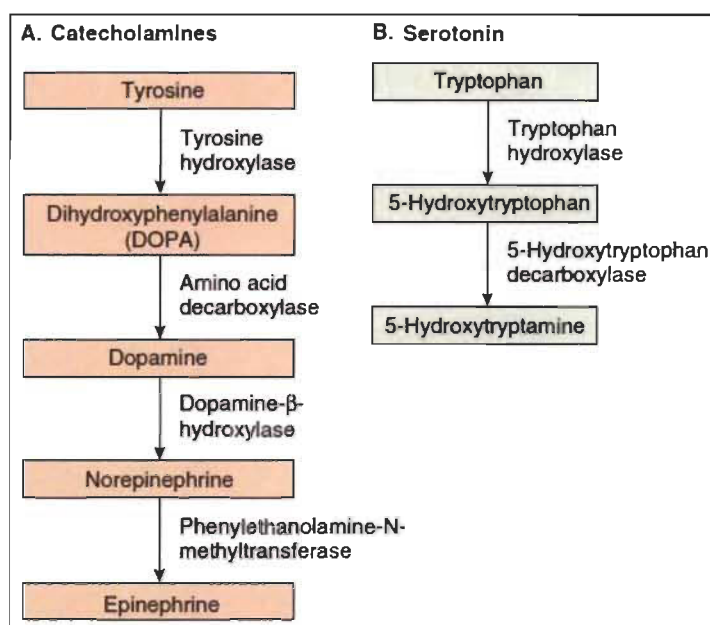


Figure 2.5 Métabolisme des (A) catécholamines (dopamine, noradrénaline et adrénaline) et de la (B) sérotonine. (Tirée et adaptée de (Purves 2018).)

La dopamine exerce son action sur cinq récepteurs dopaminergiques, divisés en deux grandes familles en fonction de leur structure et leurs propriétés pharmacologiques. La famille des récepteurs D1 comprend les récepteurs D_1 et D_5 . Exclusivement retrouvés au niveau postsynaptique, ces récepteurs sont associés à la protéine $G\alpha_s$ et leur activation a un effet généralement excitateur (Beaulieu and Gainetdinov 2011). La famille des récepteurs D2 comprend les récepteurs D_2 , D_3 , et D_4 . Ces récepteurs sont exprimés au niveau postsynaptique et directement au niveau présynaptique du neurone dopaminergique. À l'inverse de la famille des récepteurs D1, les récepteurs de la famille D2 sont généralement couplés à la protéine $G\alpha_{i/o}$ et induit un effet inhibiteur (Beaulieu and Gainetdinov 2011). La section 2.3.3 traitera en détail, au niveau striatum et dans un contexte lié à la motricité, des signalisations cellulaires associées aux deux grandes familles de récepteurs dopaminergiques.

D'un point de vue cellulaire, la noradrénaline et l'adrénaline régulent la transmission synaptique en agissant sur les récepteurs adrénergiques α_1 , récepteurs adrénergiques α_2 et les récepteurs adrénergiques β . Au système nerveux central, les récepteurs adrénergiques α_1 et β se retrouvent essentiellement au niveau

postsynaptique. Étant respectivement couplés à la protéine G_q et G_{α_s} , ils exercent généralement un effet excitateur. En comparaison, les récepteurs adrénergiques α_2 se localisent autant au niveau présynaptique que postsynaptique et ils sont associés à la protéine G_{α_o} . La stimulation de ces récepteurs diminue habituellement l'excitabilité neuronale.

Tableau 2.1

Les familles et les caractéristiques de récepteurs adrénergiques
(Tirée de (Benarroch 2009).)

Table 1 Adrenergic receptors			
Family (subtypes)	α_1 (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D})	α_2 (α_{2A} , α_{2B} , α_{2C})	β (β_1 , β_2 , β_3)
G protein	G_q	$G_{i/o}$	G_s
Transduction	PLC β -IP $_3$ -DAG	Inhibits AC	Stimulates the AC-cAMP-PKA cascade
Distribution	\uparrow [Ca $^{2+}$] _i	\uparrow K $^+$ conductance	Postsynaptic in supratentorial structures (β_2), cerebellum, blood vessels, astrocytes (β_1)
	\downarrow K $^+$ conductance	\downarrow Ca $^{2+}$ conductance	
Effects	Postsynaptic in cerebral cortex, hippocampus, thalamus, striatum, raphe, VTA	Somatodendritic autoreceptors (locus ceruleus), presynaptic noradrenergic and non-noradrenergic terminals	Promoting repetitive discharge
	\uparrow Excitability	\downarrow Spontaneous firing and excitability	Facilitates LTP
		\downarrow Neurotransmitter release	

Grâce aux modèles murins génétiquement modifiés, aux nouveaux composés pharmacologiques et à des expérimentations électrophysiologiques, d'innombrables découvertes ont été réalisées au fil des années en ce qui concerne les récepteurs sérotoninergiques. Toutefois, la spécificité fonctionnelle entre ces récepteurs reste encore une énigme et demeure, pour le moment, un sujet chaudement étudié (Pytliak, Vargova et al. 2011). Sommairement, il existe sept classes de récepteurs sérotoninergiques divisées en 14 sous-familles : 5-HT $_1$ (5-HT $_{1A}$, 5-HT $_{1B}$, 5-HT $_{1D}$, 5-HT $_{1E}$, 5-HT $_{1F}$), 5-HT $_2$ (5-HT $_{2A}$, 5-HT $_{2B}$, 5-HT $_{2C}$), 5-HT $_3$, 5-HT $_4$, 5-HT $_5$ (5-HT $_{5A}$, 5-HT $_{5B}$), 5-HT $_6$ et 5-HT $_7$. Tous ces récepteurs sont couplés aux protéines G, à l'exception du récepteur 5-HT $_3$. Quant à lui, il est un récepteur ionotrope perméable aux sodium, potassium et calcium. Il favorise la dépolarisation de la membrane cellulaire. Les récepteurs 5-HT $_1$ et 5-HT $_5$ sont couplés à la

protéine $G\alpha_{i/o}$ et leur stimulation à un effet inhibiteur sur le neurone. Les récepteurs 5-HT₂ sont associés à la protéine Gq et les récepteurs 5-HT₄, 5-HT₆ et 5-HT₇ sont liés à la protéine $G\alpha_s$. L'action de la sérotonine sur ces récepteurs accentue généralement l'excitabilité neuronale (Pytliak, Vargova et al. 2011, David and Gardier 2016).

Tableau 2.2

Les familles et les caractéristiques des récepteurs sérotoninergiques
(Tirée de (Pytliak, Vargova et al. 2011).)

Family	Potential	Type	Mechanism of action
5-HT ₁	Inhibitory	G _i /G _o -protein coupled	Decreasing intracellular concentration of cAMP
5-HT ₂	Excitatory	G _{q/11} -protein coupled	Increasing intracellular concentration of IP3 and DAG
5-HT ₃	Excitatory	Ligand-gated Na ⁺ /K ⁺ channel	Depolarization of cell plasma membrane
5-HT ₄	Excitatory	G _s -protein coupled	Increasing intracellular concentration of cAMP
5-HT ₅	Inhibitory	G _i /G _o -protein coupled	Decreasing intracellular concentration of cAMP
5-HT ₆	Excitatory	G _s -protein coupled	Increasing intracellular concentration of cAMP
5-HT ₇	Excitatory	G _s -protein coupled	Increasing intracellular concentration of cAMP

2.2.2 La schizophrénie

La schizophrénie est la maladie psychotique la plus connue. Le terme « schizophrénie » a été proposé au début des années 1900 par Eugen Bleuler, un psychiatre suisse. Ce terme, de provenance grecque, signifie « fractionnement de l'esprit ». La schizophrénie se caractérise par une atteinte de la perception de la réalité. Elle touche principalement les hommes et elle se déclenche habituellement entre 15 et 30 ans. Il est estimé que la prévalence au cours d'une vie dans la population est de 0,4 % (McGrath, Saha et al. 2008).

Selon les travaux de la neuropsychiatre Nancy Coover Andreasen, les symptômes de la schizophrénie sont classés en deux principaux groupes : symptômes positifs et symptômes négatifs. D'une part, les symptômes positifs se caractérisent par l'ajout de comportements ou d'éléments sensoriels qui ne sont pas présents chez l'individu sain. Les plus courants sont les hallucinations auditives, les délires, la déréalisation et des

comportements moteurs anormaux. D'une autre part, les symptômes négatifs se définissent par le déclin de fonctions cognitives complexes. Ce déclin cognitif peut se traduire par des pertes de mémoire, des difficultés langagières, trouble de concentration, perte de sociabilité et l'absence du plaisir (anhédonie) (Andreasen and Olsen 1982, Andreasen 1989).

Les causes exactes qui sous-tendent la schizophrénie ne sont pas encore connues. Plusieurs théories sont proposées afin d'expliquer le développement de cette maladie. Des études ont démontré que des mutations génétiques ou des polymorphismes de gènes sont associés à la schizophrénie. Les gènes codant les protéines *dysbindin*, *neuregulin 1* (NRG1), *D amino acid oxydase activator* (DAOA), *catechol-O-methyl transferase* (COMT) et *disrupted in schizophrenia 1* (DISC1) semblent les plus impliqués (Ross, Margolis et al. 2006). Il est aussi avancé que la schizophrénie pourrait être causée par une malformation structurelle du cerveau. De nombreuses études d'imagerie cérébrale chez des patients schizophrènes montrent des volumes anormaux pour diverses régions cérébrales. Parmi les régions les plus fréquemment touchées, il y a le troisième ventricule, le lobe temporal médian et le gyrus temporal supérieur. Toutefois, des anomalies volumétriques ont été relevées pour d'autres régions comme les ganglions de la base, le thalamus, l'hippocampe et le cervelet (Ross, Margolis et al. 2006). Finalement, des facteurs environnementaux, tels que la maltraitance pendant l'enfance, la consommation de diverses drogues d'abus ainsi que le stress pendant la grossesse prédisposent au développement de cette maladie (van Os and Kapur 2009).

Plusieurs neurotransmetteurs sont associés à la schizophrénie. Le neurotransmetteur clé à l'origine de nombreuses hypothèses en schizophrénie est la dopamine. Diverses études ont montré que l'expression anormalement élevée des récepteurs dopaminergiques D₂ ou une suractivation de ces récepteurs est à l'origine des symptômes psychotiques (Howes and Kapur 2009). Une autre évidence reliant le système dopaminergique à la schizophrénie est que la majorité des antipsychotiques utilisés de nos jours antagonisent préférentiellement les récepteurs dopaminergiques D₂ (Frankle and Laruelle 2002). Un autre neurotransmetteur couramment impliqué à la schizophrénie est

le glutamate. L'hypothèse du glutamate en schizophrénie se fonde sur la fonction atténuée de la signalisation glutamatergique induite par les récepteurs NMDA. À titre d'exemple, des études ont montré que des antagonistes des récepteurs NMDA reproduisent des symptômes positifs et négatifs similaires à ceux retrouvés chez les patients schizophrènes. De manière intéressante, des agonistes des récepteurs NMDA ont l'effet inverse en résorbant certains symptômes liés à la schizophrénie (Coyle 2006). Enfin, même si l'implication de la dopamine et du glutamate semble centrale à la schizophrénie, d'autres neurotransmetteurs comme la sérotonine, le GABA et la noradrénaline sont aujourd'hui considérés et étudiés afin de mieux comprendre cette pathologie (Sawa and Snyder 2002, Wassef, Baker et al. 2003).

2.2.3 Les protéines Akt-GSK3 dans la schizophrénie

Une des premières études suggérant l'implication d'Akt et GSK3 à la schizophrénie a été réalisée par Emamian et ses collaborateurs. Ils ont analysé le niveau protéique total des protéines Akt1 et GSK3 β sur des tissus post-mortem de cortex préfrontal, d'hippocampe ainsi que sur des lymphocytes provenant de patients schizophrènes. Ils ont relevé une diminution substantielle de la quantité protéique d'Akt1 et de GSK3 β dans tous les tissus post-mortem ainsi qu'au niveau des lymphocytes de patients schizophrènes analysés. De plus, cette étude rapportait une forte association génétique entre Akt1 et la schizophrénie chez les familles américaines (Emamian, Hall et al. 2004). Des études subséquentes liant Akt1 et la schizophrénie ont été réalisées chez d'autres populations, telles que chez les Japonais, les Chinois et les Écossais (Ikeda, Iwata et al. 2004, Xu, Xing et al. 2007, Thiselton, Vladimirov et al. 2008). En somme, l'ensemble de ces études met en lumière l'association génétique entre Akt et la schizophrénie.

Puisqu'il y a une forte association entre la dopamine, les récepteurs dopaminergiques D₂ et la schizophrénie, des chercheurs ont examiné les substrats moléculaires modulés par l'activation des récepteurs dopaminergiques D₂. Une étude effectuée par Beaulieu et ses collègues a démontré que l'augmentation de la stimulation des récepteurs dopaminergiques D₂ au striatum, induite par l'administration

d'amphétamine, occasionne une diminution de l'activité d'Akt et ainsi, provoque une augmentation de l'activité de GSK3. Dans le même ordre d'idée, l'augmentation de dopamine dans la fente synaptique induite par la délétion du transporteur à la dopamine (DAT) module aussi négativement l'activité d'Akt et positivement l'activité de GSK3. Les auteurs de cette étude montrent également qu'une diminution de l'activité d'Akt et une augmentation de l'activité de GSK3 engendrent des anomalies comportementales, dont l'hyperactivité et des mouvements stéréotypés. À la lumière de leurs résultats, les auteurs ont conclu que les protéines Akt et GSK3 étaient des cibles moléculaires aux récepteurs dopaminergiques D₂ et que la modulation anormale de cette signalisation pourrait contribuer au développement de la schizophrénie (Beaulieu, Sotnikova et al. 2004). D'autres études s'accordent avec les résultats issus de l'étude de Beaulieu et ses collègues. En effet, il a été démontré que l'administration d'halopéridol, un antagoniste des récepteurs dopaminergiques D₂ utilisé dans le traitement des psychoses chez les schizophrènes, augmente la phosphorylation d'Akt et de GSK3 sur ses sérines inhibitrices (Emamian, Hall et al. 2004, Bowling, Zhang et al. 2014). Dans le même ordre d'idée, d'autres antipsychotiques comme l'olanzapine et le clozapine modulent l'activité d'Akt ou miment son activité en augmentant la phosphorylation des sites inhibiteurs de GSK3 (Alimohamad, Rajakumar et al. 2005, Li, Rosborough et al. 2007). Puisque la signalisation d'Akt-GSK3 est modulée par diverses composantes du système dopaminergique, plusieurs proposent que ces kinases soient importantes dans l'étiologie et le traitement de la schizophrénie.

Les protéines DISC1, NRG1 ainsi que *dysbindin* sont reconnues pour être associées à la schizophrénie. Leurs fonctions respectives au niveau du système nerveux central varient entre la neurotransmission, la plasticité synaptique, la prolifération, la migration ainsi que la maturation neuronale. L'intérêt pour ces protéines émerge d'études génétiques qui associent des mutations ciblant ces protéines au développement de la schizophrénie dans diverses populations (Straub, Jiang et al. 2002, Harrison and Law 2006, Dickman and Davis 2009, Thomson, Malavasi et al. 2013). Au fil des années, d'autres études démontrèrent que des comportements similaires à ceux retrouvés chez des patients schizophrènes pouvaient se retrouver aussi chez des souris ayant subi des mutations

touchant les gènes codant ces protéines (Bhardwaj, Baharnoori et al. 2009, O'Tuathaigh, Harte et al. 2010, Carlson, Talbot et al. 2011, Kuroda, Yamada et al. 2011, Ma, Abazyan et al. 2013). De manière intéressante, des études illustrent que les protéines DISC1, NRG1 et *dysbindin* peuvent être modulées ou modulent la signalisation Akt-GSK3 (Emamian 2012, Zheng, Wang et al. 2012).

2.2.4 Les troubles de l'humeur

Les troubles de l'humeur se définissent par un ensemble de maladies qui module positivement ou négativement les émotions d'une personne, tout en ayant un impact sur la qualité de vie de celle-ci. Parmi les troubles de l'humeur les plus fréquents, il y a les troubles dépressifs et les troubles bipolaires. Selon le DMS-V, les troubles dépressifs se caractérisent par une grande tristesse accompagnée d'un large éventail d'émotions négatives ressenties, tel que l'anhédonie, l'impuissance, la culpabilité et le désespoir tandis que les troubles bipolaires se définissent par la fluctuation de l'humeur, oscillant entre des périodes dépressives et des périodes d'excitation intense (manie). Dans le cas des périodes maniques, souvent l'individu éprouvera de l'impatience et de l'irritabilité. Ayant un impact social et économique majeur, les troubles de l'humeur constituent une des plus grandes problématiques de santé (Wittchen, Jacobi et al. 2011, Vigo, Thornicroft et al. 2016). La prévalence des troubles de l'humeur varie en fonction des pays, du sexe et de l'âge. Aux États-Unis, la prévalence des troubles de l'humeur est d'environ 10 % sur une période de 12 mois. Ces maladies affectent deux fois plus les femmes que les hommes et émergent, en moyenne, à l'âge de 30 ans (Kessler, Chiu et al. 2005, Wang, Lane et al. 2005). Encore aujourd'hui, les causes exactes sous-jacentes aux troubles de l'humeur ne sont pas élucidées.

Une des plus vieilles hypothèses expliquant l'étiologie des troubles de l'humeur implique un déséquilibre du système des neurotransmetteurs monoaminergiques. Cette hypothèse provient d'expériences effectuées avec la réserpine. Dans les années 1950, la réserpine était utilisée pour traiter l'hypertension et la schizophrénie. Toutefois, l'utilisation de la réserpine chez certains patients causait des symptômes

semblables à ceux retrouvés dans la dépression. De manière intéressante, il était observé chez d'autres animaux que la réserpine induisait aussi des symptômes comparables à ceux retrouvés dans la dépression (Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th edition). Subséquemment, il a été démontré que la réserpine causait une déplétion du stockage de la noradrénaline, de la sérotonine et de la dopamine en bloquant VMAT (Henry and Scherman 1989).

De nombreux neurotransmetteurs semblent impliqués dans l'étiologie des troubles de l'humeur, dont la noradrénaline, la dopamine, l'acétylcholine et le GABA (Li, Frye et al. 2012). Parmi ces neurotransmetteurs, plusieurs évidences d'ordre génétique et pharmacologique suggèrent un lien fort entre le système sérotoninergique et les troubles de l'humeur. À titre d'exemple, la délétion du récepteur 5HT_{1a} chez la souris induit des comportements liés à la dépression et l'anxiété (Ramboz, Oosting et al. 1998). Dans le même ordre d'idée, les souris KO pour le transporteur à la sérotonine (SERT) développent des troubles comportementaux liés aux émotions et ne répondent pas à l'effet de plusieurs antidépresseurs (Gainetdinov, Sotnikova et al. 2002). Chez l'humain, des mutations génétiques touchant différents acteurs du système sérotoninergique sont retrouvées chez des patients atteints de troubles de l'humeur (Zhang, Gainetdinov et al. 2005). Enfin, les traitements actuels pour les troubles de l'humeur, principalement la dépression, ciblent des composantes du système sérotoninergique (Li, Frye et al. 2012).

Il y a encore plusieurs interrogations concernant la théorie des monoamines dans l'émergence des troubles de l'humeur. Plusieurs agents pharmacologiques, comme le lithium, utilisé dans le traitement de certains troubles de l'humeur, n'augmentent pas nécessairement la concentration des monoamines dans la fente synaptique (Burgess, Geddes et al. 2001). De plus, la cocaïne, une drogue d'abus qui a pour principal mécanisme d'action de bloquer la recapture de la dopamine, n'a aucun effet antidépresseur (Brady, Siegel et al. 2012). De ce fait, il est aujourd'hui reconnu que les troubles de l'humeur ont une étiologie multifactorielle et d'autres hypothèses sont avancées afin d'expliquer ces pathologies. En effet, il est aujourd'hui suggéré par plusieurs chercheurs que l'épigénétique, le système immunitaire, les rythmes circadiens ainsi que la

neuroplasticité puissent participer à l'étiologie des troubles de l'humeur (Li, Frye et al. 2012).

2.2.5 Les protéines Akt-GSK3 dans les troubles de l'humeur

Des investigations effectuées chez l'humain associent la signalisation d'Akt-GSK3 aux troubles de l'humeur. Dans une étude utilisant des cerveaux post-mortem provenant de sujets dépressifs, il a été possible d'observer une diminution de l'activité d'Akt et une augmentation de la phosphorylation de GSK3 β (Karege, Perroud et al. 2007). Dans le même ordre d'idée, des études subséquentes réalisées sur des cellules mononucléées sanguines périphériques (PBMCs) montrent que la phosphorylation de GSK3, sur les sites sérines inhibitrices, est diminuée chez des patients bipolaires (Li, Friedman et al. 2007, Pandey, Ren et al. 2010, Polter, Beurel et al. 2010). Il a aussi été relevé, dans diverses études d'ordre génétique, des associations entre les gènes codant Akt et GSK3 aux troubles de l'humeur (Inkster, Nichols et al. 2009, Karege, Perroud et al. 2010, Li and Jope 2010).

Le système sérotoninergique est fortement associé aux troubles de l'humeur, principalement la dépression. Il est donc intéressant de noter que des composantes de ce système puissent moduler les protéines Akt-GSK3. En effet, il a été démontré que l'activation des récepteurs 5HT_{1A} augmente la phosphorylation d'Akt ainsi que la phosphorylation des sérines inhibitrices de GSK3 dans plusieurs régions cérébrales (Li, Zhu et al. 2004, Polter, Yang et al. 2009). Une autre étude utilisant une souris portant une mutation du gène codant l'enzyme tryptophane hydroxylase-2, essentielle au métabolisme de la sérotonine, montre que la protéine GSK3 est suractivée. Les auteurs démontrent aussi que cette suractivation engendre des troubles comportementaux similaires à ceux retrouvés dans les troubles de l'humeur (Beaulieu, Zhang et al. 2008). Plusieurs composés pharmacologiques modulant le système sérotoninergique régulent l'activité d'Akt et GSK3. À titre d'exemple, des études montrent que le d-fenfluramine, un composé qui favorise la relâche de sérotonine dans la fente synaptique et bloque les transporteurs présynaptiques de la sérotonine, provoque une augmentation de la

phosphorylation d'Akt et celle de GSK3 sur les sérines inhibitrices (Li, Zhu et al. 2004, Polter, Yang et al. 2009).

Le lithium est un cation monovalent utilisé pour ses effets antidépresseurs et anti-maniques (Burgess, Geddes et al. 2001, Young 2017). Le mécanisme d'action exacte du lithium n'est pas encore connu. Toutefois, il est proposé que la signalisation d'Akt-GSK3 participe, au niveau moléculaire, au mécanisme d'action du lithium. En effet, des études *in vitro* ont démontré que le lithium peut mimer l'activité d'Akt en inhibant GSK3 (Klein and Melton 1996, Stambolic, Ruel et al. 1996, De Sarno, Li et al. 2002). D'autres études subséquentes effectuées *in vivo* montrent que le lithium peut moduler la phosphorylation de GSK3 sur les sérines inhibitrices dans différentes régions du cerveau de la souris ainsi qu'au niveau des PBMCs (De Sarno, Li et al. 2002, Beaulieu, Sotnikova et al. 2004, Li, Friedman et al. 2007). De ce fait, sachant qu'un modulateur d'humeur comme le lithium peut mimer l'activité d'Akt et réguler l'activité de GSK3, plusieurs hypothèses ont été soulevées, dont la possible implication de la signalisation Akt-GSK3 dans le traitement des troubles de l'humeur.

2.3 La motricité : neurobiologie du mouvement volontaire et apprentissage moteur

L'exécution d'un mouvement adéquat s'effectue selon la communication ordonnée et précise de plusieurs structures cérébrales. Ces principales structures sont le cortex frontal, les ganglions de la base, le cervelet ainsi que la moelle épinière (Purves 2018). Le cortex frontal comprend le cortex moteur qui lui, est divisé en aire prémotrice et aire supplémentaire. L'aire prémotrice intervient dans la régulation de la posture du corps et l'aire supplémentaire influence la planification du mouvement. Le cortex pariétal permet d'évaluer le contexte dans lequel le mouvement volontaire sera effectué. En recevant des informations somatosensorielles, proprioceptives et visuelles, le cortex pariétal évalue la position du corps dans l'espace. Le cortex moteur et le cortex pariétal travaillent de concert avec les ganglions de la base et le cervelet. Les ganglions de la base sont impliqués dans la sélection, la fluidité et l'initiation du mouvement tandis que le cervelet module la coordination ainsi que la précision du mouvement. Une fois que l'analyse du mouvement

est complétée par le cortex pariétal, les ganglions de la base et le cervelet, l'information est transmise au cortex moteur. Celui-ci véhicule l'information à la moelle épinière et celle-ci la transmet aux muscles afin d'effectuer le mouvement voulu (Arber and Costa 2018, Purves 2018).

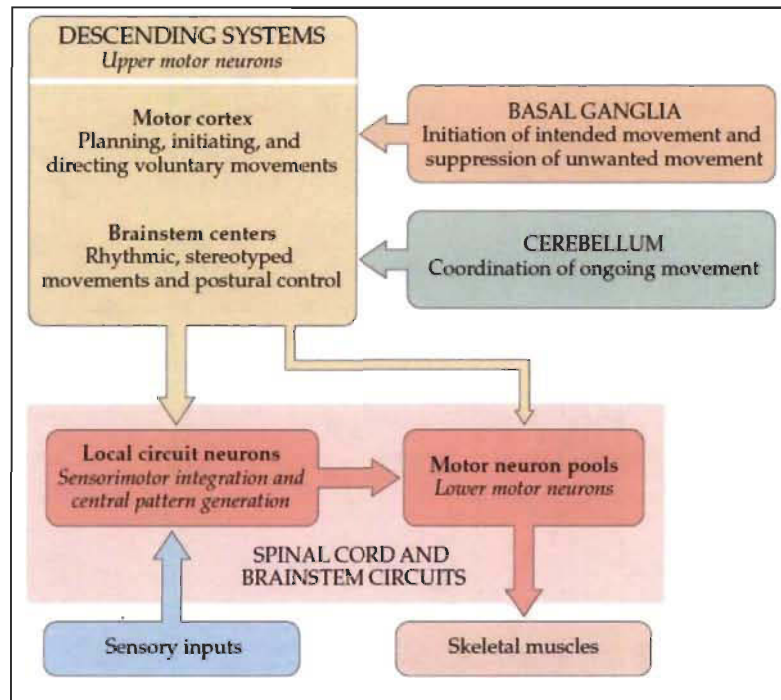


Figure 2.6 Organisation et implication des structures cérébrales impliquées dans le contrôle du mouvement volontaire.

L'exécution d'un mouvement volontaire nécessite la participation des différentes structures cérébrales, dont le cortex moteur, les ganglions de la base, le cervelet et la moelle épinière. Chacune de ces structures exerce une fonction précise afin de créer un mouvement adéquat. (Tirée de (Purves 2018).)

L'apprentissage d'une nouvelle tâche motrice complexe est absolument critique afin de s'adapter à l'environnement. Ce type d'apprentissage consiste en la capacité d'effectuer une série de mouvement le plus efficacement possible. De manière générale, l'apprentissage et la mémorisation d'une nouvelle tâche motrice s'effectuent graduellement au fil de nombreuses répétitions. En effet, afin d'effectuer une nouvelle tâche motrice facilement, celle-ci doit être réalisée à de nombreuses reprises sur plusieurs séances d'entraînement. Évidemment, le type d'apprentissage moteur aura une influence

sur la vitesse à laquelle la nouvelle tâche motrice sera maîtrisée. Contrairement à d'autres types de mémoire plus volatile, la mémorisation d'une tâche motrice perdure dans le temps; même si celle-ci n'a pas été effectuée depuis une longue période de temps, il sera aisé de réaliser une tâche motrice apprise avec un excellent degré de performance. Un bon exemple est lorsque nous recommençons à faire de la bicyclette en été, sans avoir pratiqué cette activité motrice pendant plusieurs mois. Enfin, l'apprentissage moteur sera influencé par plusieurs facteurs, dont la capacité d'exécuter un mouvement fluide et coordonné ainsi que la capacité de prendre des décisions en fonction des stimuli environnants (Lametti and Watkins 2016, Krakauer, Hadjiosif et al. 2019).

Diverses études ont permis d'établir que l'apprentissage et la mémorisation d'une tâche motrice impliquent différentes structures cérébrales et se divisent en deux principales phases : la phase rapide et la phase lente. La phase rapide correspond aux premières séances d'entraînement de la nouvelle tâche motrice. Durant cette phase, habituellement de courte durée, il y a une grande amélioration dans la réalisation et dans les performances motrices. Les réseaux cortico-cérébelleux ainsi que cortico-striatal étant actifs, ils permettent l'émergence des plans moteurs et l'élaboration d'une stratégie d'exécution. La phase lente, aussi nommée la phase de consolidation, correspond aux séances subséquentes d'entraînement. Cette phase se définit par l'amélioration plus lente des performances motrices dans le temps et par la stabilisation neuronale permettant l'encodage des séquences motrices de façon durable. Durant la phase de consolidation, le réseau cortico-striatal est impliqué davantage tandis que l'implication du réseau cortico-cérébelleux diminue. L'augmentation de l'implication du réseau cortico-striatal permet la stabilisation des performances, l'automatisation et la mémorisation à long terme de la nouvelle tâche motrice. Enfin, entre les séances d'entraînement, plus particulièrement pendant le sommeil, l'activité neuronale est particulièrement augmentée au niveau du striatum et de l'hippocampe. Cette période est importante, car elle peut influencer les gains de performances et la consolidation de la tâche motrice entre les séances d'entraînement. (Doyon and Benali 2005, Doyon, Bellec et al. 2009, Dayan and Cohen 2011).

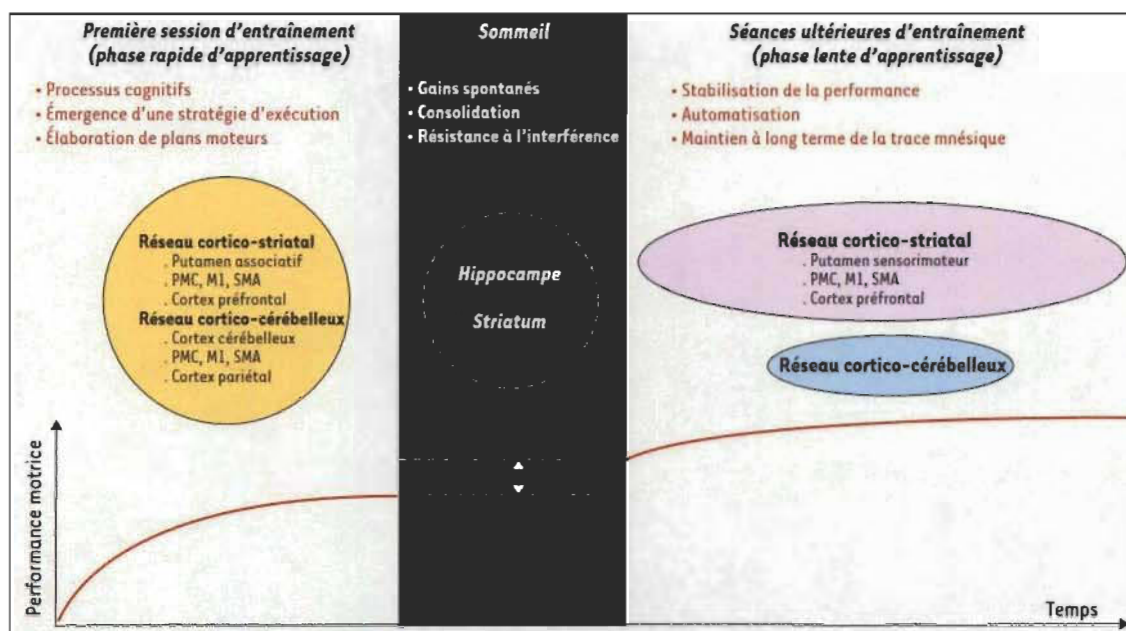


Figure 2.7 Schéma des diverses phases d'un apprentissage moteur.

Une première session d'entraînement (phase rapide) caractérisée par un gain de performance notable. Dans les séances d'entraînement subséquents, le gain dans les performances motrices se fait plus lentement. M1, cortex moteur primaire; PMC, cortex prémoteur; SMA, aire motrice supplémentaire. (Tirée de (Doyon, Orban et al. 2011).)

2.3.1 Les ganglions de la base : composition anatomique et connectivité structurale

Les ganglions de la base sont un ensemble de noyaux sous-corticaux impliqué dans la régulation d'une multitude de comportements dont la motricité, les émotions, le langage, la prise de décision et la mémoire de travail. À partir années 80 (Alexander, DeLong et al. 1986) jusqu'à tout récemment, il était considéré que les ganglions de la base fonctionnaient selon une série de boucles cortico-ganglion de la base-thalamo-corticales unidirectionnelles et parallèles. Les trois principales boucles fonctionnelles sont : la boucle motrice, la boucle associative et la boucle limbique. De manière générale, il était stipulé que diverses informations provenant des différentes aires corticales étaient transférées aux ganglions de la base. Par la suite, l'information était acheminée, dans un sens unique, au thalamus avant d'être retransmise au cortex. Ainsi, selon les études antérieures, il était défini pour la boucle motrice que l'information en provenance du cortex était transmise aux ganglions de la base pour être ensuite redirigée vers le cortex

moteur et prémoteur. Pour la boucle associative, l'information issue du cortex était relayée aux ganglions de la base et par la suite acheminée vers le cortex préfrontal dorsolatéral ainsi que pariétale. Finalement, en ce qui concerne la boucle limbique, l'information émergeant du cortex était transférée aux ganglions de la base et elle convergeait vers le cortex orbital et préfrontal médial ((Nambu, Tokuno et al. 2002, Volkmann, Daniels et al. 2010, Galvan, Devergnas et al. 2015). À la lumière de récentes évidences, il est maintenant reconnu que ce modèle de boucles indépendantes et parallèles, permettant la régulation de comportements, simplifie grandement la complexité des interactions neuronales entre les ganglions de la base et ses structures associées. Le modèle actuel suggère qu'il existe une intercommunication entre ces boucles fonctionnelles et que l'information provenant d'une boucle peut influencer le traitement et la transmission de l'information d'une autre boucle (Thorn, Atallah et al. 2010, Bostan and Strick 2018, Simonyan 2019).

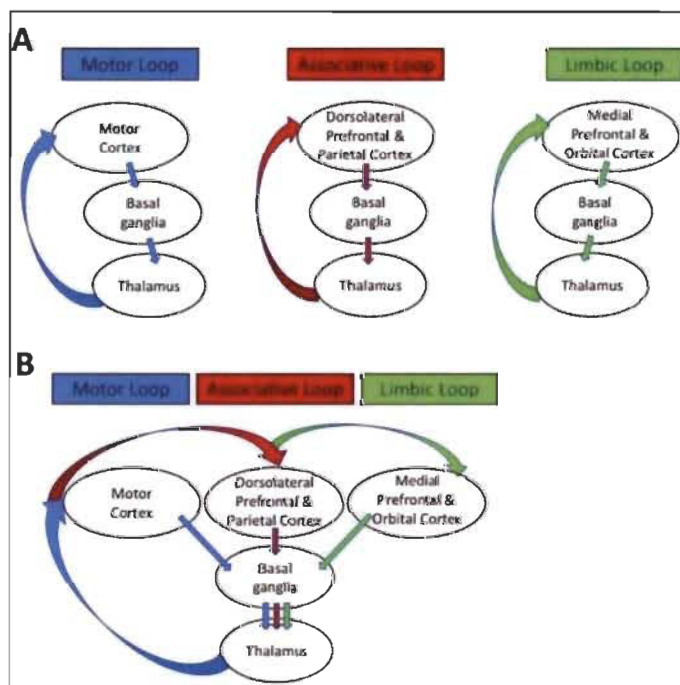


Figure 2.8 Les boucles motrices et non motrices des ganglions de la base.
 En (A), une schématisation du modèle classique où chaque boucle cortico-ganglion de la base-thalamo-corticale responsable d'une fonction comportementale se réalise de façon unidirectionnelle et en parallèle. En (B), une schématisation du nouveau modèle suggéré où il y a intercommunication et influence de l'information entre chacune des boucles cortico-ganglion de la base-thalamo-corticales. (Tirée de (Simonyan 2019).)

Pour les bienfaits de cette thèse, les prochains paragraphes se concentreront sur les fonctions motrices associées aux ganglions de la base. La portion motrice des ganglions de base est constituée du striatum (caudé et putamen), du globus pallidus interne (GPi) et externe (GPe), du noyau sous-thalamique (STN) ainsi que la substance noire réticulée (SNr) et compacte (SNc). Le striatum et le STN sont considérés comme les portes d'entrée des ganglions de la base, étant les principaux noyaux qui reçoivent l'information des aires corticale, thalamique, de la substance noire et du VTA (Lanciego, Luquin et al. 2012, Nelson and Kreitzer 2014). Anatomiquement, le striatum est divisé en deux grandes régions : le striatum dorsal et le striatum ventral. Chez le primate, le striatum dorsal est constitué du putamen en position dorsolatérale et noyau caudé en position dorsomédiale. Chez les rongeurs, le noyau caudé et le putamen ne sont pas aussi bien divisés que chez le primate. Toutefois, il reste que les fonctions associées aux régions dorsolatérale et dorsomédiale du striatum chez le primate sont similaires chez le rongeur (Voorn, Vanderschuren et al. 2004, Chuhma, Mingote et al. 2017). Le striatum dorsal serait impliqué dans la planification et l'apprentissage d'une nouvelle habileté motrice (Bonnavion, Fernandez et al. 2019). Quant à lui, le striatum ventral est constitué en grande partie par une région anatomique nommée le noyau accumbens. Celui-ci est divisé en deux sections : le cœur et la coquille. Le striatum ventral reçoit les informations glutamatergiques du cortex préfrontal et des régions limbiques. De plus, il est innervé par des neurones dopaminergiques provenant du VTA. Comparativement au striatum dorsal, le striatum ventral est impliqué dans les comportements liés à la motivation, la récompense et la dépendance aux drogues d'abus (Cardinal, Parkinson et al. 2002, Kelley 2004, Chuhma, Mingote et al. 2017, Sharpe, Stalnaker et al. 2019).

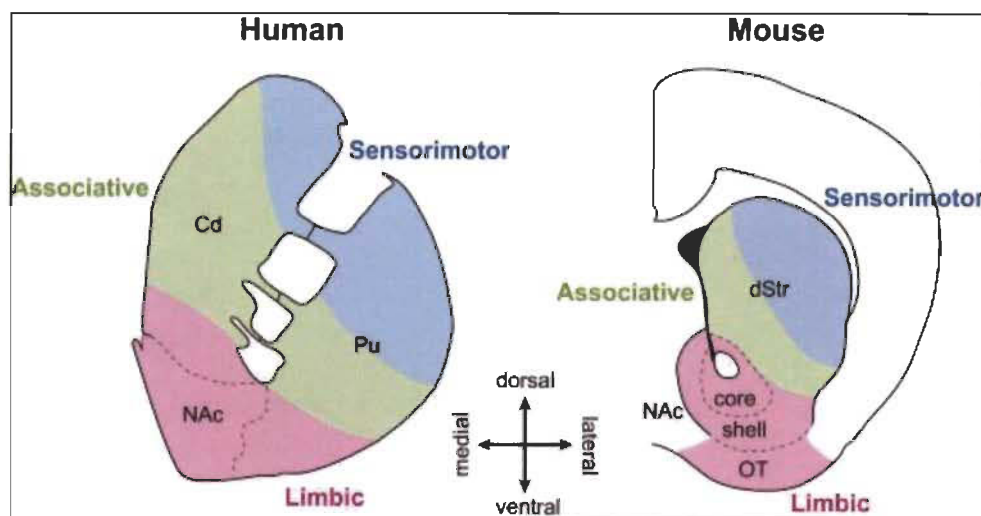


Figure 2.9 **Sous-divisions fonctionnelles du striatum chez l’humain et le rongeur.** Chez l’humain, le striatum dorsal est divisé en noyau caudé et en putamen tandis que les rongeurs, cette division anatomique est inexistante. Le striatum ventral est principalement constitué du noyau accumbens qui lui, est divisé en deux régions nommées le cœur et la coquille. Cd, noyau caudé; Pu, putamen; NAc, Noyau accumbens; dStr, striatum dorsal; OT, olfactory tubercle. (Tirée de (Chuhma, Mingote et al. 2017).)

Au début des années 2000, malgré la reconnaissance de l’implication du striatum dorsal aux fonctions motrices, la contribution exacte de la région dorsolatérale et dorsomédiale n’était pas encore bien définie. Des études chez l’humain et la souris ont permis de mieux clarifier l’importance de ces sous-divisions anatomiques du striatum à la motricité. À titre d’exemple, une étude réalisée chez l’humain, utilisant l’imagerie à raisonnement magnétique fonctionnelle, démontre que l’activité neuronale est forte dans la région dorsomédiale du striatum lors de l’acquisition (phase rapide) d’une nouvelle tâche motrice. Avec la pratique, cette activité neuronale diminue considérablement. De manière étonnante, l’activité neuronale est faible dans la région dorsolatérale lors de l’acquisition d’une nouvelle tâche motrice, mais s’accroît lorsque la tâche est de plus en plus maîtrisée (Lehericy et al. 2005). Une élégante étude réalisée par Yin et ses collaborateurs montre des résultats similaires chez la souris. Par l’entremise d’enregistrement de l’activité neuronale du striatum par électrophysiologie, les auteurs de cette étude illustrent que l’activité neuronale est plus élevée dans la région dorsomédiale pendant la phase rapide d’apprentissage (acquisition de l’habileté motrice) tandis que l’activité neuronale est beaucoup plus élevée au niveau de la région dorsolatérale lors de la phase lente

d'apprentissage (consolidation/automatisation de l'habileté motrice) (Yin et al. 2009). Aujourd'hui, des études récentes corroborent les résultats précédemment obtenus et démontrent à leur tour qu'il existe effectivement une contribution différentielle de la région dorsolatérale et dorsomédiale du striatum lors de l'apprentissage de différentes habiletés motrices (Graybiel and Grafton 2015, Vicente, Galvao-Ferreira et al. 2016, Grillner 2018, Nonomura, Nishizawa et al. 2018).

D'un point de vue cellulaire, des études immunohistochimiques et neurobiochimiques au striatum ont permis de définir deux grandes classes de neurones : les neurones épineux de taille moyenne (MSN) et les interneurones. Plus de 90 % du striatum est occupé par les MSN et ils libèrent l'acide γ -aminobutyrique (GABA) comme neurotransmetteur principal. Depuis le début des années 80, plusieurs groupes de recherche se sont concentrés à définir et catégoriser les neurones épineux moyens du striatum. En fonction des récepteurs et des protéines exprimés ainsi qu'en fonction des sites de projection, la population de MSN au striatum fut divisée en deux groupes : le premier groupe de neurones se caractérise par l'expression de la substance P, la dynorphine et des récepteurs D₁. Ces neurones projettent directement vers le globus pallidus interne (GPi) et la substance noire *pars reticulata* (SNr). Ils forment la voie directe des ganglions de la base. Lorsque les neurones de la voie directe sont activés, il y a levée de l'inhibition sur le GPi et la SNr sur le thalamus, ce qui permet à l'information d'être acheminée vers l'aire motrice supplémentaire. Cette voie est donc associée à l'initiation du mouvement. Le deuxième groupe de neurone se définit principalement par l'expression de l'enképhaline et des récepteurs dopaminergiques D₂. Ils projettent vers le globus pallidus externe (GPe) et les neurones de cette structure projettent vers le GPi/SNr. L'ensemble de ces projections forment la voie indirecte des ganglions de la base. À l'inverse de la voie directe, l'activation de la voie indirecte permet de maintenir l'inhibition induite par les neurones du Gpi/SNr sur le thalamus et d'empêcher l'information d'être acheminée vers le cortex. Cette voie est donc liée à l'inhibition du mouvement ou à la filtration des mouvements non pertinents (Lanciego, Luquin et al. 2012, Roseberry, Lee et al. 2016, Soares-Cunha, Coimbra et al. 2016). Enfin, environ 10 % du striatum est occupé par des interneurones. Il existe quatre classes

d'interneurones au niveau du striatum : les interneurones cholinergiques, les interneurones GABAergiques exprimant la parvalbumine, les interneurones GABAergiques exprimant la calrétinine et les interneurones GABAergiques exprimant le neuropeptide Y, la somatostatine ainsi que l'oxyde nitrique synthase. De plus en plus d'études soulignent l'importance des interneurones au striatum, puisqu'ils jouent un rôle important en contrôlant l'excitabilité neuronale. Cela pourra avoir un effet sur le comportement (Gittis and Kreitzer 2012, Tritsch and Sabatini 2012, Deffains and Bergman 2015). Toutefois, il est à noter qu'il existe des différences notables en ce qui concerne la densité des interneurones au sein de différentes espèces animales. Par exemple, les primates possèdent un plus grand nombre d'interneurones et ils ont plus d'interneurones GABAergiques exprimant la parvalbumine ainsi que la calrétinine en comparaison avec les rongeurs (Wu and Parent 2000). Il faut donc interpréter les résultats obtenus chez les rongeurs avec précaution et éviter les généralisations abusives en transposant ces résultats à l'humain.

Même si le consensus actuel persiste en ce qui concerne le modèle classique de la circuiterie des ganglions de la base, plusieurs soulèvent l'idée que la division des MSN en deux groupes est une façon simpliste d'organiser un réseau neuronal qui est beaucoup plus complexe. En effet, le développement de modèles transgéniques de souris et de nouvelles techniques, comme l'optogénétique, ont permis de confirmer plusieurs anciennes hypothèses (Mikell and McKhann 2010, Kravitz and Kreitzer 2012), mais ont aussi soulevé plusieurs nouvelles questions en ce qui concerne l'organisation et le rôle des MSN au striatum. À titre d'exemple, des études récentes montrent qu'il existe des sous-populations de neurones qui peuvent coexprimer, par exemple, autant la dynorphine et l'enképhaline ou autant les récepteurs D₁ et D₂. Les fonctions exactes de ces sous-populations neuronales restent à découvrir (Perreault, Hasbi et al. 2011, Kupchik, Brown et al. 2015). Aussi, il apparaît que les projections au sein des ganglions de la base, principalement celles de la voie directe et indirecte, ne soient pas aussi unidirectionnelles que préalablement statué. Une étude récente, superbement réalisée par Cazorla et ses collègues, montre que les axones des neurones de la voie directe s'arborescent dans le GPe. Cette arborisation serait sous l'influence de l'activation des récepteurs D₂ de la voie

indirecte (Cazorla, de Carvalho et al. 2014). D'un point de vue comportemental, il est aussi souligné qu'un même type de neurone puisse exercer des rôles inverses en fonction de sa localisation au sein du striatum (Al-Hasani, McCall et al. 2015, Vicente, Galvao-Ferreira et al. 2016).

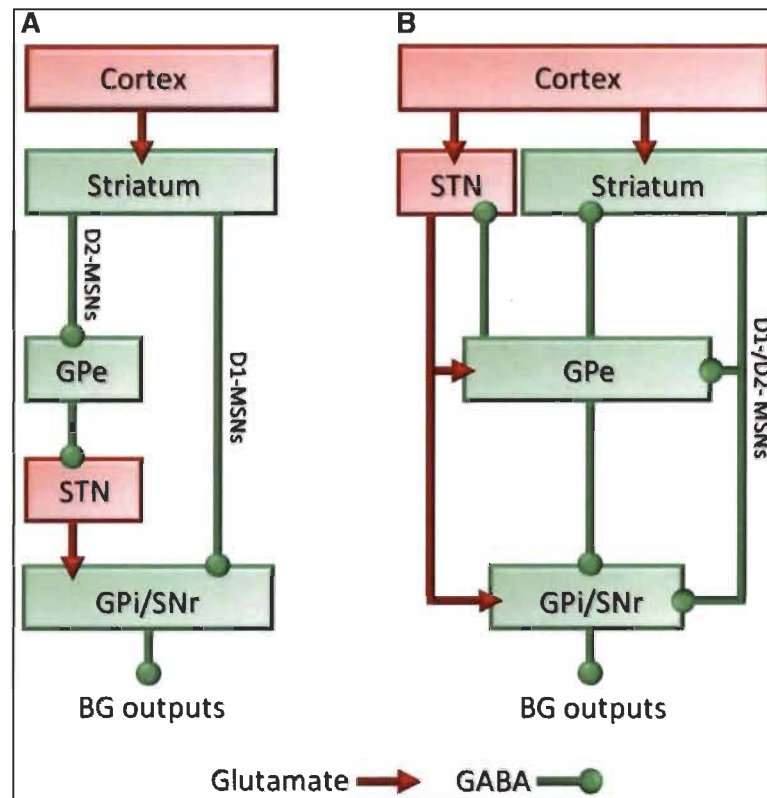


Figure 2.10 Schématisation des connexions neuronales entre les structures des ganglions de la base.

En (A), une représentation du modèle classique des connexions neuronales où l'information en provenance du cortex est acheminée au striatum. Cette information est traitée et retransmise, de manière unidirectionnelle, vers d'autres structures par l'entremise de la voie directe et indirecte. En (B), une schématisation du nouveau modèle suggéré où l'information du cortex est acheminée au STN et au striatum. Cette information sera traitée et relayée à d'autres structures dont le GPe. Celle-ci peut influencer le traitement de l'information en modulant l'activité au STN et au striatum. GPe, globus pallidus externe; STN, noyau sous-thalamique; GPi, globus pallidus interne; SNr, substance noire réticulée. (Tirée de (Deffains, Iskhakova et al. 2016).)

2.3.2 Signalisation glutamatergique et dopaminergique au striatum

Le striatum reçoit, par l'entremise de projections excitatrices du cortex, des informations considérées essentielles à la motricité. Dans le même ordre d'idée, le striatum reçoit aussi, via des afférences dopaminergiques, des informations nécessaires à la motricité. De nombreux chercheurs tentent de mieux comprendre les voies de signalisation modulées par le glutamate et de la dopamine au striatum dans un contexte lié à la motricité. Les prochains paragraphes résument les connaissances actuelles sur la modulation de ces différentes voies striatales.

Le glutamate permet la transmission des informations en provenance du cortex vers le striatum. Lorsque le glutamate est libéré à la terminaison glutamatergique, il permet l'activation des récepteurs glutamatergiques présents sur les neurones épineux du striatum. Au niveau de ces neurones, nous retrouvons principalement des récepteurs glutamatergiques ionotropes et métabotropes. Parmi les récepteurs ionotropes retrouvés, il y a les récepteurs AMPA, NMDA et kaïnate. En ce qui a trait aux récepteurs métabotropes, ils sont regroupés en fonction de leur liaison à la protéine G. Les récepteurs du groupe I (mGluR₁ et mGluR₅) sont associés à la protéine G α_q et activent la phospholipase C. Les récepteurs du groupe II (mGluR₂ et mGluR₃) et du groupe III (mGluR₄, mGluR₆, mGluR₇ et mGluR₈) sont liés à la protéine G α_i . Ils inhibent l'adénylate cyclase (AC) (Pin and Duvoisin 1995, Conn and Pin 1997, Pin and Acher 2002, Conn, Battaglia et al. 2005, Nicoletti, Bockaert et al. 2011). Les prochains paragraphes aborderont en détail la voie de signalisation induite par le glutamate lors de l'activation des récepteurs métabotropes du groupe I ainsi que des récepteurs AMPA/NMDA au niveau des neurones épineux du striatum.

Lorsque les récepteurs AMPA/NMDA sont activés par le glutamate, cela induit l'augmentation du calcium intracellulaire. Dans le même ordre d'idée, lorsque le glutamate se lie aux récepteurs métabotropes du groupe I, il y a activation de la phospholipase C (PLC), ce qui augmente la formation de l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP3). L'augmentation de l'IP3 intracellulaire permet le passage du calcium emmagasiné dans le réticulum endoplasmique vers le cytosol. Parmi les molécules centrales modulées

par l'augmentation intracellulaire de calcium, il y a la protéine phosphatase 2B (PP2B) (Liu, Ma et al. 2001, Nishi, Bibb et al. 2002, Wang, Tang et al. 2004). Tout d'abord, l'activation de la PP2B par les récepteurs glutamatergiques mène à l'activation de la protéine cdk5 via l'intermédiaire *casein kinase 1* (ck1) (Liu, Ma et al. 2001, Liu, Virshup et al. 2002). La protéine cdk5 est une sérine/thréonine kinase impliquée dans une multitude de processus cellulaires. Au niveau du striatum, l'activation de cdk5 permet d'atténuer l'activation des récepteurs dopaminergiques D₁ en interagissant avec la protéine *dopamine- and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein* (DARPP32) (Bibb, Snyder et al. 1999). La protéine DARPP32 est centrale à l'intégration des signaux modulés par la dopamine et le glutamate. D'une part, lorsque cette protéine est phosphorylée sur la thréonine 34 par la PKA, via la stimulation des récepteurs dopaminergiques D₁, il y a amplification du signal dopaminergique. D'autre part, lorsqu'il y a stimulation des récepteurs glutamatergiques, DARPP32 est soit phosphorylée sur la thréonine 75 par cdk5 ou déphosphorylée par PP2B à la thréonine 34. Cela engendre l'atténuation de la signalisation dopaminergique (Greengard, Allen et al. 1999, Greengard 2001, Nishi, Bibb et al. 2002, Valjent, Pascoli et al. 2005).

Une autre protéine activée par l'augmentation du calcium intracellulaire via l'activation des récepteurs glutamatergiques est la protéine *calcium/calmodulin-dependent protein kinase II* (CaMKII). Cette protéine permet de moduler la voie de signalisation des MAPK. La protéine CamKII active la protéine Ras, une petite protéine G liée au nucléotide guanine. Celle-ci activera à son tour la protéine kinase Raf, qui elle phosphoryle les *mitogen-activated protein kinase kinase 1/2* (MEK1/2). Finalement, MEK1/2 phosphorylent et activent les protéines *extracellular signal-regulated kinases 1/2* (ERK1/2) (Mao, Tang et al. 2004, Wang, Fibuch et al. 2007, Fasano, D'Antoni et al. 2009). Une fois activées, les protéines ERK1/2 peuvent réguler plusieurs fonctions cellulaires via l'activation d'une multitude de substrats. À titre d'exemple, ERK1/2 peut moduler l'excitabilité neuronale en favorisant l'ouverture des canaux K_v4.2 ou induire la transcription de nouveaux gènes en activant CREB (Vanhoutte, Barnier et al. 1999, Valjent, Caboche et al. 2001, Birnbaum, Varga et al. 2004, Thomas and Huganir 2004). Au final, la modulation de voie menant à ERK1/2 est particulièrement importante dans les

processus liés à la plasticité synaptique (Thomas and Huganir 2004, Shiflett and Balleine 2011, Cerovic, d'Isa et al. 2013).

La dopamine est le second neurotransmetteur d'importance au striatum impliqué dans la modulation de la motricité. L'activation des récepteurs D_1 mène au détachement de la sous-unité de la protéine G ($G\alpha$) des autres sous-unités ($G\beta\gamma$). Ce détachement permet à la sous-unité $G\alpha$ d'activer l'adénylate cyclase (AC). Cette enzyme catalysera l'adénosine-5'-triphosphate (ATP) en adénosine 3', 5'-monophosphate cyclique (AMPc). L'augmentation du second messenger AMPc dans le neurone se traduit par l'activation de la PKA. Une fois activée, la PKA sera en mesure de phosphoryler une pléthore de substrats, dont des canaux ioniques, de récepteurs, des facteurs de transcription et des phosphoprotéines. L'un des principaux substrats de PKA est DARPP32 (Svenningsson, Nishi et al. 2004). Lorsque PKA phosphoryle DARPP32 sur la thréonine 34, cela induit l'inhibition de la protéine phosphatase 1 (PP1) (Hemmings, Greengard et al. 1984, Greengard, Allen et al. 1999). L'inhibition de PP1 se traduit par une diminution de la déphosphorylation de la protéine *striatal-enriched protein tyrosine phosphatase* (STEP), permettant l'activation de ERK1/2 (Valjent, Pascoli et al. 2005). L'activation de ERK1/2 module les facteurs de transcriptions CREB et C-fos. La protéine CREB peut aussi être directement activée par PKA via la phosphorylation du site sérine 133 (Gonzalez and Montminy 1989, Sgambato, Pages et al. 1998, Zanassi, Paolillo et al. 2001).

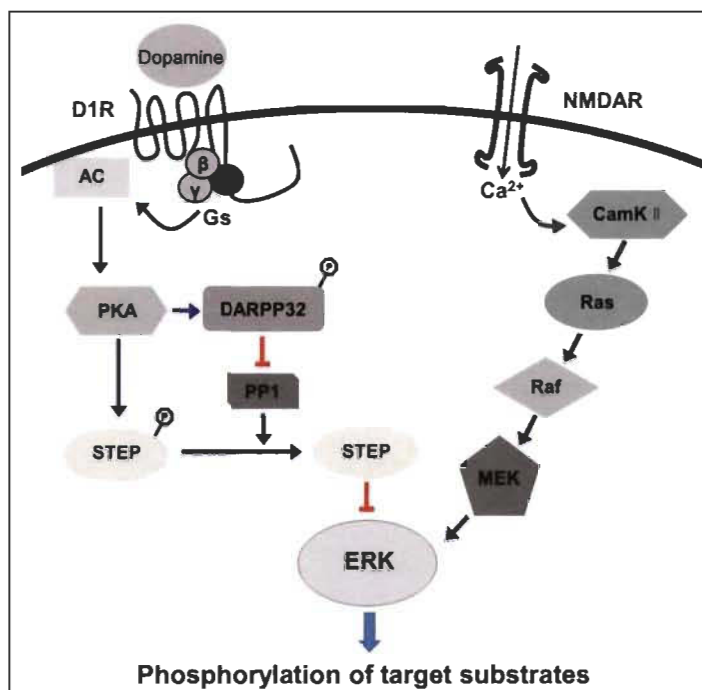


Figure 2.11 Schématisation simplifiée des signalisations cellulaires médiées par les récepteurs D1 et les récepteurs NMDA au striatum. (Tirée de (Baik 2013).)

Au niveau du striatum, il y a trois grandes voies de signalisation associées à l'activation des récepteurs dopaminergiques D₂. La première voie de signalisation est l'inverse de la signalisation induite par les récepteurs dopaminergique D₁. En effet, en étant associés à des protéines G inhibitrices ($G_{i/o}$), les récepteurs dopaminergiques D₂ induisent l'inactivation de l'AC et l'inhibition de PKA (Nishi, Snyder et al. 1997, Bateup, Svenningsson et al. 2008). La seconde voie de signalisation des récepteurs D₂ est celle qui permet d'agir sur des canaux ioniques via la sous-unité $G_{\beta\gamma}$ des protéines G. Au moment où la dopamine active le récepteur dopaminergique D₂, la sous-unité $G_{\beta\gamma}$ peut activer la PLC ou inhiber les canaux calciques dépendants du voltage. L'action de la sous-unité $G_{\beta\gamma}$ sur ces substrats permet de relâcher du calcium stocké dans le réticulum endoplasmique. La sous-unité $G_{\beta\gamma}$ peut aussi réguler les courants potassiques en activant les *G protein-coupled inwardly rectifying potassium channel* (GIRK) (Hernandez-Lopez, Tkatch et al. 2000, Lavine, Ethier et al. 2002). Enfin, la dernière voie médiée par les récepteurs dopaminergiques D₂ est indépendante des protéines G. Cette signalisation s'opère par l'entremise des *G protein – coupled Receptor Kinase* (GRK) et aux arrestines. Lors de la

stimulation du récepteur dopaminergique D₂, il y a dissociation des protéines G et il y a le recrutement des GRK. La phosphorylation induite par les GRK au récepteur permet le recrutement de la β -arrestine 2. Ce recrutement engendre la formation d'un complexe avec la PP2A et la forme active de la protéine Akt. Dans ce complexe, le PP2A déphosphoryle Akt, ce qui mène à l'activation de GSK3 (Beaulieu, Sotnikova et al. 2005).

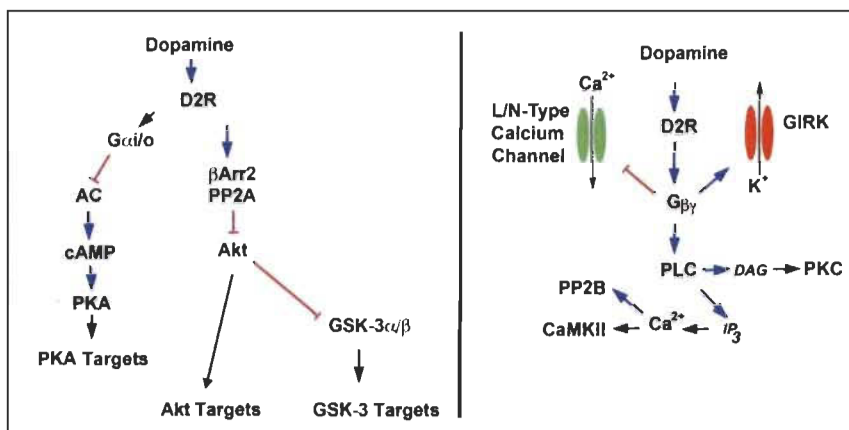


Figure 2.12 Les voies de signalisation cellulaire modulées par le récepteur D₂ au striatum. (Tirée et modifiée de (Beaulieu and Gainetdinov 2011).)

2.3.3 Les protéines Akt-GSK3-mTOR dans les fonctions motrices

L'un des principaux neurotransmetteurs impliqués dans les fonctions motrices au striatum est la dopamine. Dans certaines circonstances, ce neurotransmetteur peut moduler des comportements moteurs par l'entremise de l'activation des protéines Akt, GSK3 et mTOR. À titre d'exemple, la délétion du gène codant le transporteur à la dopamine (DAT) chez la souris se caractérise par une concentration en dopamine extracellulaire cinq fois plus grande qu'en condition physiologique et une plus grande activité locomotrice mesurée par l'*open field* (Gainetdinov, Wetsel et al. 1999). Des études démontrent que cette hyperactivité locomotrice serait induite, d'une part par l'inhibition de l'activité d'Akt sur GSK3 et d'autre part, par l'activation de la protéine mTOR ainsi que ses substrats 4EBP1 et P70S6K. En effet, l'activation d'Akt ainsi que l'inhibition pharmacologique de GSK3 ou de mTOR chez la souris DAT KO permet de rétablir l'activité locomotrice à un niveau comparable à celui de souris au phénotype sauvage (Beaulieu, Sotnikova et al. 2004, Sutton and Caron 2015, Wong, Sze et al. 2015). Dans le même ordre d'idée,

certaines composés pharmacologiques moduleraient l'activité motrice par les protéines Akt, GSK3 et mTOR. L'amphétamine est un composé qui augmente la concentration de la dopamine synaptique et augmente l'activité locomotrice (Seiden, Sabol et al. 1993). Une étude réalisée par Gould et ses collaborateurs démontrent que la correction de la suractivité de GSK3 par le lithium atténue considérablement l'hyperactivité locomotrice induite par l'amphétamine (Gould, O'Donnell et al. 2007). Une autre étude démontre que la cocaïne provoque une hyperactivité chez le rongeur par le biais d'une augmentation de la phosphorylation des protéines mTOR, 4EBP et P70S6K au niveau de diverses régions cérébrales (Wu, McCallum et al. 2011, Sutton and Caron 2015). De manière intéressante, lorsqu'il y a inhibition pharmacologique de mTORC1 avec de la rapamycine, l'hyperactivité induite par la cocaïne n'est plus observée (Wu, McCallum et al. 2011). Malgré ces évidences de la littérature, qui associent les protéines Akt, GSK3 et mTOR à certains comportements moteurs, l'implication de ces protéines à la régulation des habiletés motrices en condition physiologique ainsi que dans l'apprentissage d'une nouvelle tâche motrice complexe reste à découvrir.

CHAPITRE III

HYPOTHÈSES DE TRAVAIL ET MÉTHODOLOGIES COMPORTEMENTALES

3.1 Quel est l'impact de la délétion d'Akt3 chez la souris sur les comportements associés aux émotions, à la mémoire et à la motricité?

Chez les mammifères, la kinase Akt se retrouve sous trois isoformes : Akt1, Akt2 et Akt3. Dans les dernières années, plusieurs études ont démontré que malgré une forte homologie structurale au sein de ces trois isoformes, celles-ci exercent des rôles distinctifs. De manière générale, il est reconnu que la protéine Akt régule une multitude de fonctionnalités cérébrales, dont la croissance axonale et la plasticité synaptique. De plus, cette kinase serait impliquée dans l'étiologie et dans la manifestation clinique des certaines maladies psychiatriques, comme la schizophrénie et la bipolarité. Toutefois, l'implication distinctive des trois isoformes d'Akt dans ces fonctions cérébrales en condition physiologique et pathologique n'est pas encore bien définie.

Considérant que l'isoforme Akt3 est la plus exprimé au cerveau et qu'elle régule la croissance cérébrale, nous avons émis l'hypothèse qu'Akt3 pourrait jouer un rôle spécifique dans la régulation de comportements associés aux émotions, à la mémoire et à la motricité, sans être compensée par la présence des deux autres isoformes. Afin de valider cette hypothèse, nous avons examiné l'effet de la délétion du gène codant Akt3 chez la souris. Tout d'abord, nous avons réalisé une multitude de tests comportementaux ciblant la mémoire, la motricité, la sociabilité, l'anxiété, la résilience ainsi que le filtrage sensorimoteur. Parallèlement, nous avons évalué les mécanismes de LTP à l'hippocampe par électrophysiologie. Ensuite, nous avons déterminé si la délétion d'Akt3 pouvait moduler les autres isoformes d'Akt ainsi que le substrat GSK3 dans diverses structures cérébrales. Finalement, à la lumière des résultats comportementaux et biochimiques obtenus, nous avons réalisé une expérience supplémentaire à l'aide du lithium afin de déterminer l'effet de ce modulateur de l'humeur sur les anomalies comportementales

associées au syndrome anxio-dépressif. Les résultats issus de cette étude sont présentés dans le premier article de cet ouvrage, en chapitre IV.

3.2 Est-ce que la signalisation de la protéine mTOR est impliquée dans la régulation des habiletés motrices ainsi que dans la mémorisation d'une nouvelle tâche motrice complexe?

L'acquisition et la consolidation d'habiletés motrices jouent un rôle essentiel dans notre quotidien. C'est ce qui nous permet de réaliser diverses tâches, comme écrire, jouer au golf ou faire de la bicyclette. La réalisation et la mémorisation d'une tâche motrice nécessitent diverses structures cérébrales, dont le cortex, le striatum, le cervelet et l'hippocampe. Parmi ces structures, plusieurs études associées aux nôtres démontrent que le striatum serait le centre de la mémorisation d'une nouvelle tâche motrice complexe. Au niveau du striatum, différents neurotransmetteurs, dont principalement la dopamine et le glutamate, modulent des voies de signalisation qui sont à l'origine de l'encodage de la mémoire motrice. Toutefois, les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'action de ces neurotransmetteurs à la réalisation d'une tâche motrice sont encore peu connus.

La protéine mTOR est une sérine/thréonine kinase régulant diverses fonctions cellulaires, dont la croissance axonale, l'arborisation synaptique, la synaptogénèse et la synthèse de nouvelles protéines. Des investigations soulignent l'importance de cette protéine aux processus de plasticité synaptique et à la formation de la mémoire. En effet, il a été relevé que plusieurs voies de signalisation impliquant mTOR sont critiques à la LTP et la LTD. Par ailleurs, des expériences comportementales liées à la mémoire, dont l'apprentissage spatiale et la reconnaissance des objets, dépendent de l'activité de mTOR. Enfin, il n'est toujours pas connu si l'activité de mTOR est modulée et influence l'exécution ainsi que la mémorisation motrice.

À la lumière de ces évidences, nous avons émis l'hypothèse que la signalisation de la protéine mTOR participe, au niveau du striatum, aux processus moléculaires nécessaires à l'apprentissage et la mémorisation d'une nouvelle tâche motrice. De ce fait, nous avons évalué si l'apprentissage d'une nouvelle tâche motrice au rotarod module la

phosphorylation de mTOR. Ensuite, en utilisant deux approches pharmacologiques et une approche génétique, nous avons examiné l'effet de l'inhibition de l'activité striatale de mTOR sur l'exécution et l'apprentissage d'une nouvelle tâche motrice. Les résultats de cette étude sont présentés dans le deuxième article de cet ouvrage, au chapitre V.

3.3 Outils comportementaux dans un contexte d'étude lié à la mémoire, aux émotions et à la motricité chez la souris

Pour la compréhension de cette thèse, les tests comportementaux utilisés dans l'étude *Genetic Deletion of Akt3 Induces an Endophenotype Reminiscent of Psychiatric Manifestations in Mice* seront présentés (Chapitre IV) et dans l'étude *mTOR signaling contributes to motor skill learning in mice* (Chapitre V) seront présentés.

Les bons tests cognitifs isolent et identifient les fonctions neuronales de régions cérébrales spécifiques en examinant des comportements dans un environnement bien contrôlé. Tel que mentionné dans l'introduction, l'hippocampe est une structure cérébrale essentielle à la formation de la mémoire, autant chez l'humain et que chez la souris. De nombreux tests comportementaux, ciblant l'apprentissage ainsi que la mémorisation associée à l'hippocampe, ont été développés et réalisés chez les rongeurs. Parmi ces tests, nous avons utilisé le *Morris water maze* ainsi que le *novel object recognition*. Le *Morris water maze* a été conçu par Richard Morris au début des années 80. Sommairement, ce test peut être divisé en deux portions : la première consiste à déposer des souris à tour de rôle dans un bassin rempli d'eau colorée et elles doivent retrouver une plate-forme submergée à l'aide de repères visuels. Dans les premiers essais, les souris nagent de façon plutôt aléatoire en utilisant des stratégies comme longer les parois du bassin ou naviguer au centre du bassin. Toutefois, après quelques essais, les souris adaptent et modifient leur stratégie de recherche de la plate-forme en utilisant les repères visuels. Dans la deuxième portion du test, la plate-forme est retirée du bassin, les souris sont déposées à tour de rôle dans l'eau et le temps d'investigation dans le cadran où la plate-forme était précédemment installée est mesuré. Cette mesure permet de confirmer, indirectement, si les souris ont bien mémorisé l'emplacement de la plate-forme (Vorhees and Williams 2014, Tucker,

Velosky et al. 2018). Le *novel object recognition* permet d'évaluer l'habileté d'un rongeur à reconnaître un nouvel objet dans un environnement. Habituellement, un rongeur est de nature curieux et aura tendance à investiguer des objets qui ne lui sont pas familiers. Ce test est divisé en trois phases étendues sur trois journées : l'habituation, la familiarisation et la phase test. Au premier jour, soit pendant la phase d'habituation, les souris sont déposées et explorent l'habitacle expérimental en absence des objets. À la deuxième journée, dans la phase de familiarisation, les souris sont placées à nouveau dans l'habitacle expérimental, mais cette fois-ci en présence de deux objets identiques localisés dans des coins opposés et symétriques. Finalement, à la phase test se déroulant au troisième jour, les souris explorent l'habitacle expérimental dans lequel se trouve un des objets de la phase de familiarisation et un nouvel objet. De manière générale, les rongeurs préfèrent la nouveauté; s'ils ont mémorisé correctement les objets dans la phase de familiarisation, ils exploreront plus longuement le nouvel objet (Antunes and Biala 2012, Lueptow 2017, Denninger, Smith et al. 2018). Enfin, ces tests comportementaux ne sont pas sans point négatif. En ce qui concerne le *Morris water maze*, la réalisation en condition fortement éclairée, l'effet aversif de l'eau et l'intégrité des fonctions motrices peuvent avoir un impact sur les résultats. Dans le même ordre d'idée, la sélection des objets, leur positionnement dans l'habitacle expérimental ainsi que la qualité du nettoyage entre les essais influencent les résultats dans le *novel object recognition*. Malgré ces défauts, ces tests comportementaux possèdent plusieurs avantages majeurs, dont la reproductibilité des résultats, la simplicité de leur mise en place ainsi que leur grande efficacité à évaluer les processus d'apprentissage et mémorisation liés à l'hippocampe (Antunes and Biala 2012, Vorhees and Williams 2014, Lueptow 2017, Denninger, Smith et al. 2018, Tucker, Velosky et al. 2018). Il n'est donc pas surprenant que ces tests soient utilisés depuis plusieurs décennies et encore largement utilisés aujourd'hui.

Plusieurs tests comportementaux investiguant les émotions ont été réalisés dans le cadre de cette thèse. Dans l'objectif d'identifier des comportements liés à l'anxiété humaine chez la souris, nous avons utilisé l'*open field*, de l'*elevated-plus maze* et du *Light-Dark test*. Ces tests se fondent sur cette dualité entre l'esprit curieux d'une souris et

l'investigation d'un environnement anxigène. De façon générale, une souris aura tendance à examiner des endroits nouveaux, même si ceux-ci sont anxigènes. Toutefois, lorsqu'une souris démontre des comportements de type anxieux, elle examinera dans une moindre mesure les nouveaux endroits et préférera se positionner à un endroit sombre et fermé. Dans l'*open field*, les animaux peuvent explorer une boîte ouverte. Une souris anxieuse aura tendance à longer les parois de la boîte, puisque le centre de cette boîte sera considéré comme un endroit de vulnérabilité (Lezak, Missig et al. 2017). Dans l'*elevated-plus maze*, la souris a l'occasion d'explorer un module surélevé en forme de croix où il y a deux bras fermés et deux bras ouverts. L'aversion induite par l'ouverture des bras ouverts et la hauteur du module nous permet d'observer une exploration moins fréquente de ces régions chez les souris exprimant un comportement anxieux (Walf and Frye 2007, Komada, Takao et al. 2008). En ce qui a trait au *Light-dark test*, les souris peuvent explorer une région sombre ou une région hautement illuminée d'un module cubique. Une souris qui démontre un comportement anxieux n'aura pas tendance à investiguer la région éclairée et préférera la région sombre (Bourin and Hascoet 2003, Takao and Miyakawa 2006). Dans tous les tests présentés, le paramètre qui permet de définir un comportement de type anxieux chez la souris est le temps d'exploration et le nombre de transitions dans la zone anxigène. Afin d'étudier les comportements liés à la dépression humaine, nous avons utilisé le *tail suspension test* et le *forced swim test*. Dans ces deux tests, les souris sont placées dans une situation sans issue. Il y a mesure du niveau de combativité, qui correspond au temps où les souris nagent en continu. Plus la souris est dans un état déprimé, moins elle aura tendance à se débattre (Cryan, Mombereau et al. 2005, Petit-Demouliere, Chenu et al. 2005). Finalement, nous avons déterminé chez la souris d'autres comportements associés à des maladies psychiatriques humaines, dont l'asociabilité et un déficit du filtrage sensorimoteur. Habituellement, une souris saine sera de nature sociale et aura tendance à vouloir entrer en contact avec une souris inconnue. De ce fait, le paradigme expérimental des trois chambres (*Crawley's sociability and preference for social novelty test*) permet d'évaluer le niveau de sociabilité chez la souris. Le principe de ce test se fonde sur la liberté d'une souris à explorer une souris inconnue encagée ou une cage vide. Une souris qui exprimera de l'asociabilité n'aura aucune préférence entre la souris encagée ou de la cage vide (Mao, Ge et al. 2009,

Kaidanovich-Beilin, Lipina et al. 2011). Enfin, il est possible d'évaluer le filtrage sensorimoteur à l'aide du test du réflexe acoustique de sursaut (PPI). Ce test se traduit par une réponse du corps tout entier (sursaut) à un bruit fort et inattendu. En condition normale, la présentation d'un son faible (*prepulse*) de quelques millisecondes avant le bruit fort diminue le sursaut (Valsamis and Schmid 2011). Chez les schizophrènes et chez les souris modèles de la schizophrénie, la diminution du sursaut induite par la présence du faible son avant le fort bruit n'est pas ou peu présente comparativement à des sujets sains (Braff, Geyer et al. 2001, Nestler and Hyman 2010). Il est à noter qu'au laboratoire, nous n'avons pas l'*open field* ainsi que l'appareil permettant d'évaluer le test du réflexe acoustique de sursaut (PPI). De ce fait, ces tests ont été réalisés et les données ont été compilées par des experts du centre de neurophénotypage de l'Institut universitaire en santé mentale Douglas.

Il faut prendre en considération que l'étude des émotions et des maladies psychiatriques humaines chez la souris est un défi de taille. En partie, l'absence de langage et l'absence d'expressions faciales ne permettent pas de comprendre ou d'identifier adéquatement l'état d'esprit chez les rongeurs comme nous pouvons le faire chez les humains. Associés à des expériences histologiques, biochimiques et d'électrophysiologie, l'utilisation de ces tests comportementaux, malgré leurs défauts, nous permettent d'identifier et d'associer, chez différents modèles animaux, des symptômes cliniques retrouvés dans des pathologies humaines. En sommes, il est possible de mieux définir les mécanismes à l'origine de ces maladies (Belovicova, Bogi et al. 2017, Sukoff Rizzo and Crawley 2017).

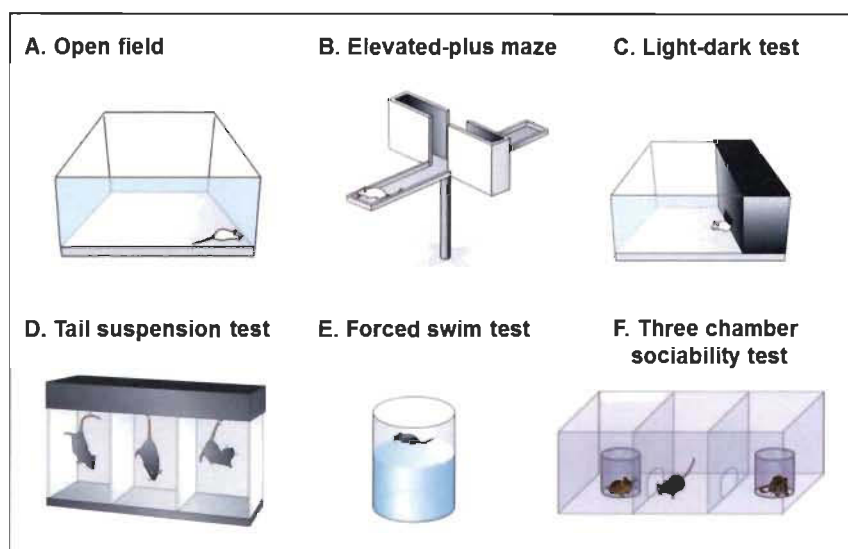


Figure 3.1 Différents tests comportementaux associés à l'évaluation des émotions chez la souris. (Tirée et modifiée de (Cryan, Mombereau et al. 2005).)

Dans l'objectif de mesurer les fonctions motrices chez la souris, nous avons utilisé le *pole*, le *wire* et le *stepping test*. En premier lieu, le *pole test* consiste à déposer une souris à l'extrémité supérieure d'une tige et de mesurer le temps requis afin qu'elle atteigne la base. En deuxième lieu, dans le *wire test*, les souris sont suspendues au centre d'un fil attaché à deux plates-formes. Le temps nécessaire à la souris pour se rendre à l'une de ces plates-formes est mesuré. Finalement, le *stepping test* consiste à surélever les souris par la queue de sorte que seules ces membres antérieurs touchent à la surface. Ensuite, en tirant la souris sur une distance établie, il y a calcul du nombre de pas effectués par chacun des membres antérieurs. Ces tests, qui permettent de mesurer la coordination, la force musculaire, la bradykinésie et l'akinésie, sont couramment utilisés chez des animaux modèles de maladies motrices, dont la maladie de Parkinson et la dystrophie musculaire (Blume, Cass et al. 2009, Aartsma-Rus and van Putten 2014, Rial, Castro et al. 2014, Purves 2018, Billings, Gordon et al. 2019).

Afin de mesurer l'apprentissage d'une nouvelle tâche motrice, nous avons utilisé le rotarod. Sommairement, ce test consiste à déposer une souris sur un cylindre suspendu et celui-ci accélère dans le temps. Afin de ne pas tomber, la souris doit s'ajuster à l'accélération du cylindre en adaptant ses stratégies motrices. Plusieurs raisons expliquent

notre choix : comme chez les humains qui apprennent une nouvelle tâche motrice, il est possible d'observer, chez les souris entraînées au rotarod, des gains de performances mesurables à court (à l'intérieur d'une journée) et à long terme (plusieurs journées). De plus, une longue absence d'entraînement n'a pas d'effet sur les performances motrices des souris ayant consolidées (automatisées) cet apprentissage moteur. Chez l'humain, l'apprentissage moteur module l'activité et induit des changements structuraux dans différentes structures cérébrales. Des études de notre laboratoire, jumelées à des études d'autres groupes de recherche, démontrent des changements cellulaires et moléculaires similaires dans diverses structures cérébrales associés à l'apprentissage moteur lors des différentes phases d'entraînement au rotarod chez la souris (Buitrago, Schulz et al. 2004, Yin, Mulcare et al. 2009, Bureau, Carrier et al. 2010, D'Amours, Bureau et al. 2011, Durieux, Schiffmann et al. 2012, Chagniel, Bergeron et al. 2014). Finalement, comparativement à d'autres tests, nous utilisons le test du rotarod dans un contexte indépendant de récompense ou de stimuli aversifs. Cela nous permet d'isoler l'apprentissage moteur de facteurs indirects, dont la motivation positive et le renforcement négatif.

Les principales critiques associées à l'utilisation du rotarod sont que les souris peuvent s'accrocher aux rainures du cylindre, que certaines souris peuvent refuser de courir sur le cylindre, que le poids des souris peut influencer les performances et qu'à vitesse élevée, les souris tombent par fatigue. Chacun de ces éléments peut être surveillé et corrigé. Premièrement, en utilisant un cylindre avec de petites rainures ou sans rainures, les souris ne peuvent plus s'accrocher. Deuxièmement, il est très rare de retrouver des souris qui refusent de courir dans une cohorte. Si elles se présentent, il est possible de les retirer du groupe. Troisièmement, en ce qui concerne l'effet du poids sur les performances motrices, il est important de peser les souris afin d'avoir des groupes homogènes. Quatrièmement, il est possible de mesurer si la fatigue entre en jeu dans les plateaux de performances motrices en effectuant des essais à différentes vitesses constantes (Brooks and Dunnett 2009).

Enfin, le rotarod s'avère un excellent test afin de mesurer l'apprentissage moteur chez la souris et constitue un test fréquemment utilisé dans ce cadre expérimental (Brooks and Dunnett 2009, Sommer, Costa et al. 2014, Cao, Ye et al. 2015, Owen, Berke et al. 2018). Dans une vision plus globale, il est évident que l'apprentissage d'une nouvelle tâche motrice au rotarod ne peut refléter avec 100 % d'exactitude la complexité et le temps requis de certains apprentissages moteurs réalisés chez les humains, comme jouer au tennis ou apprendre à jouer du piano. Tel que suggéré par Krakauer (Krakauer, Hadjiosif et al. 2019), même si l'apprentissage de tâche motrice chez la souris ne nous permet pas de comprendre la grande complexité sous-jacente à l'apprentissage d'une tâche motrice chez l'humain, cela nous permet de jeter les bases et de développer des notions fondamentales associées à ce type d'apprentissage.

Finalement, nous avons réalisé des injections systémiques et intrastriatales de rapamycine. Les doses des injections de rapamycine ont été sélectionnées en fonction de précédentes études ayant démontré l'efficacité de l'inhibition de mTORC1 *in vivo* et dans diverses structures cérébrales (Bekinschtein, Katze et al. 2007, Blundell, Kouser et al. 2008, Glover, Ressler et al. 2010, Stoica, Zhu et al. 2011, Jobim, Pedrosa et al. 2012).

CHAPITRE IV

GENETIC DELETION OF AKT3 INDUCES AN ENDOPHENOTYPE REMINISCENT OF PSYCHIATRIC MANIFESTATIONS IN MICE

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en anglais dans la revue « *Frontiers in Molecular neuroscience* ». La référence de cet article est la suivante :

Bergeron Y., Bureau G., Laurier-Laurin ME., Asselin E., Massicotte G. et Cyr M. (2017) "Genetic deletion of Akt3 induces an endophenotype reminiscent of psychiatric manifestations in mice", *Front. Mol. Neurosci.*, 2017; 10: 102. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00102

4.1 Contribution des auteurs

Les travaux présentés ont été réalisés par Yan Bergeron, sous la supervision du Dr Michel Cyr. La création du projet et des expériences ont été réalisées par Yan Bergeron sous l'expertise du Dr Michel Cyr. Geneviève Bureau (auxiliaire de recherche) a contribué aux expériences comportementales. Marie-Élaine Laurier-Laurin a réalisé les expériences d'électrophysiologie. Yan Bergeron a écrit le manuscrit en collaboration avec le Dr Michel Cyr. Le Dr Eric Asselin a fourni les souris Akt3 KO. L'analyse et l'interprétation des résultats ont été réalisées par Yan Bergeron sous la supervision des Drs Guy Massicotte et Michel Cyr.

4.2 Résumé de l'article (français)

La protéine kinase B (PKB/Akt), retrouvée sous trois isoformes différents (PKB α /Akt1, PKB β /Akt2, PKB γ /Akt3), est impliquée dans une multitude de processus cellulaires comme la croissance et la survie. Même si l'isoforme Akt3 est la plus exprimée au cerveau, son implication précise dans les fonctions cérébrales n'est toujours pas connue. Dans cette étude, nous avons évalué la conséquence biochimique, électrophysiologique ainsi que comportementale de la délétion du gène codant la protéine Akt3 chez la souris. Nos résultats montrent que les habiletés motrices, la mémoire spatiale, la reconnaissance des objets ainsi que la LTP sont intactes chez les souris Akt3 KO. Toutefois, les résultats obtenus des expériences réalisées à l'aide du paradigme expérimental des trois chambres, du test du réflexe acoustique de sursaut, de l'*open field*, de l'*elevated-plus maze*, du *Light-Dark test*, du *tail suspension test* et du *forced swim test* montrent que les souris Akt3 KO expriment des comportements anormaux associés à des maladies psychiatriques comme la schizophrénie, la dépression et l'anxiété. Au niveau biochimique, nos résultats montrent que la délétion d'Akt3 induit une diminution de la phosphorylation de la protéine GSK3 $\alpha\beta$ aux sérines 21/9 dans plusieurs régions du cerveau, sans toutefois avoir d'impact sur le niveau total d'Akt1 et d'Akt2. L'administration du lithium, un stabilisateur de l'humeur, permet d'augmenter la phosphorylation de la protéine GSK3 $\alpha\beta$ aux sérines 21/9 et permet aussi de récupérer le phénotype dépressif et anxieux observé chez les souris Akt3 KO. En somme, nos résultats suggèrent que la protéine Akt3 chez la souris pourrait être une molécule importante à la régulation normale de comportements retrouvés dans certaines maladies psychiatriques.

4.3 Premier article scientifique :

Genetic deletion of Akt3 induces an endophenotype reminiscent of psychiatric manifestations in mice

Abstract

The protein kinase B (PKB/Akt), found in three distinctive isoforms (PKB α /Akt1, PKB β /Akt2, PKB γ /Akt3), is implicated in a variety of cellular processes such as cell development, growth and survival. Although Akt3 is the most expressed isoform in the brain, its role in cerebral functions is still unclear. In the present study, we investigated the behavioral, electrophysiological and biochemical consequences of Akt3 deletion in mice. Motor abilities, spatial navigation, recognition memory and LTP are intact in the Akt3 knockout (KO) mice. However, the prepulse inhibition, three-chamber social, forced swim, tail suspension, open field, elevated plus maze and light-dark transition tests revealed an endophenotype reminiscent of psychiatric manifestations such as schizophrenia, anxiety and depression. Biochemical investigations revealed that Akt3 deletion was associated with reduced levels of phosphorylated GSK3 α/β at serine 21/9 in several brain regions, although Akt1 and Akt2 levels were unaffected. Notably, chronic administration of lithium, a mood stabilizer, restored the decreased phosphorylated GSK3 α/β levels and rescued the depressive and anxiety-like behaviors in the Akt3 KO mice. Collectively, our data suggest that Akt3 might be a critical molecule underlying psychiatric-related behaviors in mice.

Introduction

Psychiatric illnesses such as depression, bipolar disorders, anxiety and schizophrenia represent an important public health problem causing not only personal suffering but also a tremendous economic burden (Wittchen, Jacobi et al. 2011, Vigo, Thornicroft et al. 2016). Over the recent years, many studies have highlighted the role of genetic variations, abnormal neural development and dysregulation of neurotransmitters to explain the development of these disorders (Renoir 2014). Even if these discoveries have led to a plethora of pharmacological treatments, their efficacy is still limited (Gould and Einat 2007, Duman and Voleti 2012). Therefore, identification of key cell signaling molecules and pathways are critical to uncover novel therapeutic targets and successful clinical interventions.

A family of serine/threonine kinases, the protein kinase B (PKB/Akt), has received extensive consideration in recent years for its possible involvement in psychiatric conditions. For instance, Akt activity is known to be modified by antidepressants, antipsychotics and mood stabilizers (Beaulieu, Gainetdinov et al. 2009). The Akt protein is constituted by three isoforms termed Akt1/PKB α , Akt2/PKB β and Akt3/PKB γ . Despite the fact that they are showing strong homologies, these isoforms are encoded by distinct genes (Diez, Garrido et al. 2012). The most abundant isoforms is Akt1. Akt1 is ubiquitously expressed whereas Akt2 is primarily expressed in insulin-responsive tissues and Akt3 is very much expressed in brain and testes (Hers, Vincent et al. 2011). Understanding brain Akt functions has been gained by the generation of transgenic and knockout mouse models (Yang, Tschopp et al. 2004, Dummmler, Tschopp et al. 2006). For instance, a partial lethality is observed in mice lacking Akt1 and the surviving mice are reduced in size at birth and remain small throughout life (Cho, Mu et al. 2001, Yang, Tschopp et al. 2003). Akt2 is particularly important for glucose metabolism (Cho, Mu et al. 2001, Garofalo, Orena et al. 2003) and a role in photoreceptor survival is observed (Li, Anderson et al. 2007). Recently, signs of anxiety and depressive-like behaviors have been reported in mice lacking Akt2 (Leibrock, Ackermann et al. 2013). The role of Akt3 is less clear even though it appears to be the most highly expressed isoform in the brain. Mice lacking Akt3 exhibit small brains. (Easton, Cho et al. 2005, Poduri, Evrony et al. 2012).

It is noteworthy that a multi-stage schizophrenia genome-wide association study has identified Akt3 as a potential contributor to schizophrenia, which underscore the importance of investigating the role of Akt3 in the brain (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics 2014).

The goal of the present study is to define the behavioral, electrophysiological and biochemical consequences of Akt3 deletion in mice. Our findings reveal that Akt3 deletion in mice does not affect motor, cognitive and synaptic functions, but is associated with behavioral abnormalities reminiscent of psychiatric symptoms. Notably, the depressive and anxiety-like behaviors are reversed by a chronic lithium treatment. Our data provide evidence that Akt3 signaling may play a role in the pathogenesis of psychiatric conditions.

Material and methods

Animals

This study was carried out in accordance with the recommendations of the UQTR Institutional Animal Care and Use Committee and performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care. The generation of Akt3 KO mice has been described previously (Easton et al., 2005). In all experiments, 12-18 weeks-old Akt3 KO male mice (C57bl/6j background) and their respective wild type (WT) littermates were used. They were housed in groups of 3-4 per cage (12 h light-dark cycles) with *ad libitum* food and water. Akt3 KO and WT mice were genotyped by PCR analysis of DNA samples obtained from ear punches. Five sets of experiments were conducted on five independent cohorts of WT and Akt3 KO mice. (1) One set of experiments involved behavioral testing run from least to most invasive, to decrease the chance that behavioral responses are altered by prior test. Morris water maze, novel object recognition, elevated plus maze, light-dark transition, three-chamber social test, forced swim test (FST) and tail suspension test (TST) were performed in this sequence in drug naïve WT and Akt3 KO mice. (2) Another set investigates, in order, the rotarod,

wire suspension, pole and stepping tests. (3) The open field and prepulse inhibition tests were performed at the Neurophenotyping Centre (Douglas Mental Health Institute, Montreal, QC, Canada). (4) One set included drug naïve WT and Akt KO mice exclusively for electrophysiology experiments. Finally, (5) one set investigated the elevated plus maze and FSTs in four groups of mice: WT-Standard chow, WT-Lithium, Akt3 KO-Standard chow and Akt3 KO-Lithium

Behavioral Tests

To performed comprehensive behavioral analyses of WT and Akt3 KO mice, we used previously well-characterized tests (Crawley 2008). A period of 30 min of habituation in the experimental room was allowed prior the test. All tests were performed between 8 a.m to 4 p.m and were separated from each other by 2 days at least.

Motor ability tests: General motor behavior of mice was evaluated using the rotarod, the wire suspension, pole and stepping tests as we described previously (Chagniel, Bergeron et al. 2014). First, mice were pre-trained on the rotarod (AccuScan Instruments, Columbus, OH, USA) 5 times at a constant rate of 10 rpm. A resting time of 180 s was allowed between each trial. The end of a trial was considered when mice were falling off the rod or when they reached 150 s. The next day following the pre-training, mice performed the rotarod 3 times at a constant rate of 10 rpm and latency to fall was recorded for each trial. Briefly, the wire suspension test consisted to hang the animal with its paws on the middle of a wire fixed horizontally between two platforms (length: 80 cm, height: 25 cm). The time needed to reach one platform was recorded. For the pole test, mice were placed at the upper end of a pole (length: 50 cm, diameter: 1.5 cm). The time taken to turn down and reach the base of the pole was recorded. A maximum time of 120 s was allowed to execute the wire suspension and pole test. The stepping test consists to lift up the mouse's hind legs by pulling up the tail, leaving only the forepaws on the table. Then, the experimenter pulled the animal backward by the tail (1 m in 5–6 s), until the other edge of the table was reached. Each trial was recorded using a video camera and the number of adjusting steps for both forepaws was calculated.

Morris water maze: In a circular pool (122 cm of diameter) filled with opaque water (23°C), mice learning and memory was evaluated. For spatial acquisition, mice were trained to reach the submerged platform (12 x 10 cm) 4 times per day for 5 consecutive days. Latency to find the platform was measured. On the 6th day, a probe trial was given. The platform was withdrawn from the pool and the time of exploration in each quadrant was measured.

Novel Object Recognition: Mice were habituated 10 minutes in the test box (40 x 40 cm) for 3 consecutive days. On day 4, two identical objects (dice) were placed in the opposite corners of the box and mice were allowed to explore for 10 min. 24 hours later, one of the familiar objects was replaced by a novel object (red ball) and mice were left in the box exploring for 10 min. The session was recorded using a video camera and exploration of the familiar or the novel object was evaluated. Exploration of the object was considered when a mouse displayed any investigative behaviors (head toward object, sniffing closely or entering an area within 1 cm around the object).

Prepulse Inhibition: PPI was assessed in a sound-attenuated chamber (8 x 16 cm). The session began with a 5 min acclimation to a background noise of 70 dB. This is followed by a 10 trials block of a 120 dB startle stimulus (without prepulse). Then, to assess PPI, the startle stimulus was preceded by a 30 msec prepulse stimulus. The intensity of the prepulse varied between 73 and 85 dB, in increment of 3 dB. Each intensity intervals were presented 5 times and were randomly generated. The inter-trial intervals were variable from 5 to 30 sec with an average of 15 sec. Startle responses were collected every 1 msec for 100 msec after startle stimulus and were averaged for each prepulse intensity. Percentage of prepulse inhibition was calculated as: $[(\text{startle} + \text{prepulse}) / \text{startle}] \times 100$.

Three-chamber social test: Mice were tested for social interactions using a three-chamber box (20 x 40 cm, each chamber). First, the mouse was placed in the central chamber and was allowed to explore the entire box for a 5 min habituation session. In the session I, which evaluate sociability, the mouse was given the choice to interact with either an empty wired cage (9 cm of diameter, 11 cm height, placed in one side chamber) or an

unfamiliar mouse (stranger I) placed in a similar cage on the other side chamber. For 10 min, the tested mouse was allowed to explore and the time spent exploring the empty cage and the stranger I was recorded. In the session II, which test the preference for social novelty, a second unfamiliar mouse (stranger II) was placed in the empty chamber. The time spent exploring the stranger I or the stranger II was recorded for 10 min.

Forced swim test: Mice were deposited individually into a transparent plastic cylinder (20 cm height, 15 cm diameter), filled with water (11 cm deep, kept at 25°C). Immobility time (no limb movement) was measured in the last 4 min of the 6 min recorded session.

Tail suspension test: Mice were suspended by the tip of the tail 35 cm to the ground for a period of 6 min. Immobility time was measured on the last 4 min of the test. Mice were considered immobile when they ceased struggling and remained motionless.

Open Field: Mice were placed 60 min in a box (1 x 1 m) for habituation. After habituation, the time spent in the central zone were recorded and measured for 90 min with Versamax software (Accuscan Instruments, USA).

Elevated plus maze: The elevated plus maze consisted in a cross-shaped platform with two open and two closed arms, elevated 50 cm above the floor. Mice were placed in the center of the maze facing one of the closed arms. Mice were allowed to explore the cross-shaped platform for 10 min. The number of entries as well as the time spent in the open and closed arms were measured.

Light-dark transition: The apparatus consisted in a box (40 × 40 cm) divided into two equal sections. One chamber was brightly illuminated, whereas the other chamber was dark. Mice were placed into the dark area and allowed to move freely between the two chambers through an open door for 10 min. The total number of transitions from the dark to the light chamber and the time spent into the light chamber were recorded.

Chronic lithium treatment

For chronic lithium treatment (LiCl), mice were placed on a 0.2% LiCl diet (Harlan Teklab, WI, USA) for 5 days followed by a 0.4% LiCl diet for an additional 20 days (O'Brien, Harper et al. 2004). All mice received drinking water supplemented with 0.9% saline to reduce ion imbalance caused by polyurea of lithium treatment. Control group mice were fed with standard chow. Behavioral experiments began on day 10. At day 26, mice were anesthetized under isoflurane, decapitated and brains were immediately removed. At the same time, blood was collected through a cardiac puncture for lithium serum dosage. Lithium levels in the serum samples were measured with a flame photometer (Perkin-Elmer, model Analyst 100). The hippocampus, striatum, anterior cortex and cerebellum were dissected rapidly and frozen on dry ice until processed for western blots analysis.

Biochemical analysis

WT and Akt3 KO mice were anesthetized under isoflurane, decapitated and brains were immediately removed. The striatum, hippocampus, cerebellum, and anterior cortex were dissected, frozen on dry ice and preserved at -80°C. The western blots were performed as previously described (Bergeron, Chagniel et al. 2014). Antibodies used were raised against Akt1, Akt2, Akt3, phosphorylated GSK3 α/β at serine 21/9 (Cell signaling, 1:1000), total GSK3 α/β (Millipore, 1:2000) and GAPDH (Abcam, MA, USA 1:20000). Membranes were washed and incubated with appropriate HRP-conjugated secondary antibody (Cell signaling, 1:5000). To visualize protein bands, chemiluminescence reactions were used (SuperSignal West Femto chemiluminescence kit, Pierce Chemical Co, IL, USA). Densitometry analysis was performed using the VisionWorks LS software (UVP bioimaging Upland, CA, USA) and expressed as relative optical density.

Electrophysiology

Hippocampal slice preparation was performed as described before (Laurier-Laurin, De Montigny et al. 2014). Briefly, WT and Akt3 KO mice were anesthetized under isoflurane, decapitated and hippocampi were dissected in an ice-cold cutting buffer. Transverse slices (350 μ m) were prepared with a McIlwain tissue chopper and transferred in artificial cerebrospinal fluid. The slices were allowed to recover 1h before recordings. A glass recording electrode (1-5 M Ω ; filled with 2 M NaCl) was positioned in the stratum radiatum of area CA₁ of the hippocampus to record field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) evoked by a bipolar electrode (twisted 60 μ m nichrome), activating fibers of the Schaffer collateral system. Stimulation consisted of a 0.1 msec pulse delivered every 30 sec (0.033 Hz) with current intensity adjusted to obtain 40-50% of maximal fEPSPs. After a 10 min baseline period, theta-burst stimulations (10 bursts of 4 stimulation pulses at 100 Hz) were given at 200 msec (5 Hz) intervals. After this block of tetanic stimulation, fEPSPs were again collected at the baseline presentation rate (0.033 Hz). In all cases, fEPSPs were recorded with NAC 2.0 software (Theta Burst Corp., Irvine, CA, USA) and the response to stimulation was quantified by calculating the initial amplitude of resulting fEPSPs.

Statistical analysis

Data were analysed with GraphPad Prism software (version 5.0, Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Statistical analysis were determined by unpaired Student's t-test, two-way repeated-measures analysis of variance followed by the Bonferroni *post hoc* test or by paired Student's Wilcoxon t-test. Data are shown as the mean \pm SEM and statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Levels of Akt isoforms in the Akt3 KO mouse brain

Akt protein levels were assessed by Western blot in the anterior cortex, striatum, hippocampus and cerebellum. As expected, Akt3 protein was undetectable in brain regions examined in Akt3 KO mice (Figure 1A). To evaluate whether Akt1 or Akt2 expression was affected by the Akt3 deletion, levels of Akt1 and Akt2 were also measured. Compared to WT mice, levels of Akt1 and Akt2 remained unchanged in Akt3 KO brain structures considered (Figure 1A).

Normal motor abilities and cognitive functions in Akt3 KO mice

To verify the effect of Akt3 deletion on general motor abilities, we performed well recognized motor tests: the rotarod, the pole, wire suspension and stepping tests. No difference was observed between Akt3 KO and WT performances in all tests, revealing that Akt3 KO mice do not suffer from a generalized deficit in locomotion, motor abilities and activity levels (Figures 2A–D).

To study the impact of Akt3 deletion on cognitive functions, we performed the Morris water maze and the novel object recognition tests. After five days of training in the Morris water maze, two-way repeated measures ANOVA followed by the Bonferroni *post hoc* test revealed that Akt3 KO and WT mice required similar time to find the hidden platform (genotype, $F_{(1,135)} = 1.388$; $p > 0.05$; days, $F_{(4,135)} = 23.36$; $p < 0.001$; genotype x days, $F_{(4,135)} = 0.2930$; $p > 0.05$) (Figure 2E). During the probe test, Akt3 KO and WT mice spent more time in the target quadrant compared to other quadrants (genotype, $F_{(1,108)} = 0.02350$; $p > 0.05$; quadrant, $F_{(3,108)} = 25.06$; $p < 0.001$; genotype x quadrant, $F_{(3,108)} = 0.2847$; $p > 0.05$) (Figure 2E). In the novel object recognition test, two-way ANOVA followed by the Bonferroni *post hoc* test revealed that both mice groups explored preferentially the novel object rather than the familiar object (genotype, $F_{(1,38)} = 0.4278$; $p > 0.05$; objects, $F_{(1,38)} = 23.12$; $p < 0.001$; genotype x objects, $F_{(1,38)} = 1.254$; $p > 0.05$) (Figure 2F).

Adjacent coronal brain slices containing the hippocampus from Akt3 KO and WT mice were prepared for electrophysiological experiments. Theta-burst stimulation of the Schaffer commissural pathway in area CA1 of the hippocampus was then used to elicit synaptic potentiation. In the present investigation, evoked fEPSPs were statistically compared immediately and 40 min after theta-burst stimulation to determine the possible impact of Akt3 deletion on short-term and long-term potentiation, respectively. We found that neither short nor long-term potentiation was modified in Akt3 KO mice compared to WT mice (paired Student's Wilcoxon t-test, $p > 0.05$; Figure 2G).

Akt3 KO mice exhibit an endophenotype reminiscent of psychiatric conditions

Social behavior was evaluated by the three-chamber social test. In the Session I, two-way ANOVA followed by the Bonferroni *post hoc* test showed that Akt3 KO and WT mice explored preferentially the cage with a stranger mouse than an empty cage. Interestingly, Akt3 KO mice showed significantly lower investigation time of stranger mouse than WT mice, reflecting impaired social behavior (cage type, $F_{(1,34)} = 38.18$; $p < 0.001$; genotype, $F_{(1,34)} = 10.09$; $p < 0.01$; cage type \times genotype, $F_{(1,34)} = 2.361$; $p > 0.05$) (Figure 3A). In the Session II, the preference for social novelty was measured. WT mice spent more time exploring the novel stranger mouse II than the familiar stranger mouse I, while Akt3 KO mice did not show preference between stranger mouse I and II (cage type, $F_{(1,32)} = 23.08$; $p < 0.05$; genotype, $F_{(1,32)} = 6.829$; $p < 0.001$; cage type \times genotype, $F_{(1,32)} = 5.362$; $p < 0.05$) (Figure 3A). The PPI test was performed to evaluate sensorimotor gating. Two-way ANOVA followed by the Bonferroni *post hoc* test revealed an overall decrease in PPI responses in Akt3 KO mice compared to WT mice (intensity, $F_{(4,105)} = 39.85$; $p < 0.001$; genotype, $F_{(1,105)} = 58.46$; $p < 0.001$; intensity \times genotype, $F_{(4,105)} = 1.609$; $p > 0.05$) (Figure 3B).

We next examined depressive-like behaviors in mice. In the forced swim and the tail suspension tests, Akt3 KO mice spent more time immobilized compared to WT mice (unpaired t-test, $p < 0.001$; Figures 4A, B). Anxiety-related behaviors were also evaluated. The open field test revealed that Akt3 KO mice were less active (unpaired

t-test, $p < 0.001$) and covered a shorter distance in the central zone compared to WT mice (unpaired t-test, $p < 0.001$; Figure 4C). The elevated-plus maze showed that Akt3 KO mice spent a lower proportion of time in the open arms (unpaired t-test, $p < 0.05$) and entered less frequently in the open arms compared to WT mice (unpaired t-test, $p < 0.01$; Figure 4D). Finally, we observed in the light-dark transition test that Akt3 KO mice spent a lower proportion of time (unpaired t-test, $p < 0.01$) and exhibited a lower number of transitions in the lighted chamber compared to WT mice (unpaired t-test, $p < 0.05$; Figure 4E).

Chronic lithium treatment rescued depressive and anxiety-like behaviors observed in Akt3 KO mice

We next investigated whether the deletion of Akt3 in mice could affect GSK3, a known direct downstream target of Akt. Our western blot analysis revealed that levels of phosphorylated GSK3 α/β at serine 21/9 were significantly decreased in the anterior cortex (unpaired t-test, GSK3 α : $p < 0.01$; GSK3 β : $p < 0.01$), striatum (unpaired t-test, GSK3 α : $p < 0.001$; GSK3 β : $p < 0.01$), hippocampus (unpaired t-test, GSK3 α : $p < 0.01$; GSK3 β : $p < 0.05$) and cerebellum (unpaired t-test, GSK3 α : $p < 0.01$; GSK3 β : $p < 0.01$) of Akt3 KO mice (Figure 5A). In every Akt3 KO brain structures analysed, no difference in levels of total GSK3 α/β was observed compared to WT mice.

To verify the effect of a chronic treatment on the depressive and anxiety-like phenotypes observed in Akt3 KO mice, we used the mood stabilizer lithium (Figure 5B). The serum lithium concentrations were measured in mice at the end of treatments. Regardless of mice genotype, lithium concentration achieved a mean of 0.89 ± 0.07 mM in mice fed with lithium chow, whereas levels in mice fed with normal chow were undetectable. In the forced swim test, two-way ANOVA followed by the Bonferroni *post hoc* test revealed that chronic lithium treatment significantly decreased immobility time in Akt3 KO and WT mice (treatment, $F_{(1,19)} = 76.67$; $p < 0.001$; genotype, $F_{(1,19)} = 6.446$; $p < 0.05$; treatment x genotype, $F_{(1,19)} = 7.338$; $p < 0.05$) (Figure 5C). In the elevated plus maze, two-way ANOVA showed that Akt3 KO mice treated with lithium spent more time in open arms (treatment, $F_{(1,34)} = 0.2912$; $p > 0.05$; genotype,

$F_{(1,34)} = 1.240$; $p > 0.05$; treatment \times genotype, $F_{(1,34)} = 6.129$; $p < 0.05$) and entered more frequently in the open arms compared to Akt3 KO fed with normal chow (treatment, $F_{(1,34)} = 5.099$; $p < 0.05$; genotype, $F_{(1,34)} = 0.1706$; $p > 0.05$; treatment \times genotype, $F_{(1,34)} = 15.20$; $p < 0.001$) (Figure 5D).

Chronic lithium treatment increased the levels of phosphorylated GSK3 α/β in the anterior cortex (unpaired t-test, GSK3 α : $p < 0.01$; GSK3 β : $p < 0.01$), striatum (unpaired t-test, GSK3 α : $p < 0.001$; GSK3 β : $p < 0.001$) and hippocampus (unpaired t-test, GSK3 α : $p < 0.05$; GSK3 β : $p < 0.01$) of Akt3 KO mice (Figures 6A–D). Only levels of phosphorylated GSK3 α were increased in the cerebellum (unpaired t-test, GSK3 α : $p < 0.05$; GSK3 β : $p > 0.05$) of Akt3 KO mice. The lithium treatment had no effect on the levels of total GSK3 α/β (Figures 6A–D).

Discussion

The specific function of Akt3 isoform in the brain is poorly understood. Our study on Akt3 KO mice reports that Akt3 deletion is associated with normal spatial learning and memory as revealed by the Morris water maze and novel object recognition tests. In addition, our results in the rotarod, pole, wire and stepping tests provide evidence that the Akt3 KO mice do not suffer from a generalized deficit in locomotion, motor abilities and activity levels. In fact, Akt3 deletion rather evokes changes in mouse behaviour reflecting psychiatric manifestations reminiscent of schizophrenia, anxiety and depression. For instance, Akt3 KO mice exhibited reduced prepulse inhibition and social novelty, two phenotypes often seen in animal models of schizophrenia (Nestler and Hyman 2010). In particular, the prepulse inhibition is disrupted in patients suffering from schizophrenia (Braff, Geyer et al. 2001) and asociality is considered to be one of the most problematic symptoms of schizophrenia (Murphy, Chung et al. 2006). Our results in two antidepressant-sensitive tests, the force swim and tail suspension tests, and three anxiogenic tests, the open field, the elevated-plus maze and the dark-light tests, suggest that deletion of Akt3 increases susceptibility to develop symptoms related to depression and anxiety. Altogether, these comprehensive behavioral manifestations

propose that Akt3 signaling contributes to the normal functioning of the neural circuitry intervening in the symptoms associated with schizophrenia, depression and anxiety.

Systematic behavioral studies have never been performed on the Akt3 KO mice before. However, it is established that these mice have a reduction in brain weight resulting from a decline in both cell size and number, but preserve normal glucose homeostasis and body weights (Easton, Cho et al. 2005, Tschopp, Yang et al. 2005). Based on these observations, it is believed that Akt3 could be an important regulator of postnatal brain development (Tschopp, Yang et al. 2005). Interestingly, mood disorders such as schizophrenia and major depression showed common and distinct patterns of volumetric alteration relative to healthy individuals in a number of brain areas (Wright, Rabe-Hesketh et al. 2000, van Tol, van der Wee et al. 2010, Balevich, Haznedar et al. 2015, Wise, Radua et al. 2016). The possibility that the observed psychiatric-like behaviors may originate from the reduced brain volume induced by Akt3 deletion is interesting, but highly speculative. A small number of clinical studies suggest that a copy number variation at the Akt3 locus could be associated with abnormal brain size. For instance, individuals with Akt3 deletions show microcephaly (Boland, Clayton-Smith et al. 2007), while duplications or gain-of-function Akt3 mutations are associated with megalencephaly (Riviere, Mirzaa et al. 2012, Wang, Zeesman et al. 2013, Nellist, Schot et al. 2015) and focal cortical dysplasia (Chung, Eydoux et al. 2014). Whether Akt3 is the only responsible gene for these witnessed clinical phenotypes is unclear. Further investigations are definitively required in order to untangle the putative brain consequence of impaired Akt3 activity. It is becoming apparent, however, that Akt3 plays a critical role in brain development and psychiatric manifestations in mice.

While the link between deletion of Akt3 isoform and psychiatric behaviors has never been established before, impaired Akt activity was previously suspected in psychiatric conditions. For example, post-mortem tissue samples from patients with schizophrenia showed significant reductions of phosphorylated Akt levels in hilar neurons of the dentate gyrus and the neurogenic zone of the hippocampus (Balu, Carlson et al. 2012). Akt activity is decreased in some brain regions (occipital cortex and ventral prefrontal cortex) of

depressed patients (Hsiung, Adlersberg et al. 2003, Karege, Perroud et al. 2007). Phosphorylated Akt levels in the ventral tegmental area are markedly decreased in mice subjected to a depression model induced by stress, an effect reversed by fluoxetine (Krishnan, Han et al. 2008). The study of normal physiological functions of each Akt isoform in the adult brain has been made possible recently by the generation of knockout mouse models. Basic behavioral profiling of Akt1 KO mice showed that there are no overall motor, anxiety and widespread cognitive behavioral deficits, although displaying abnormal working memory involving the hippocampus (Lai, Xu et al. 2006, Balu, Carlson et al. 2012). On the other hand, Akt2-deficient mice exhibit normal growth, but develop a diabetes-like syndrome with elevated fasting plasma glucose levels, elevated hepatic glucose output, and peripheral insulin resistance (Cho, Mu et al. 2001, Garofalo, Orena et al. 2003). Lately, Akt2 deletion has been associated with anxiety and depressive-like behaviors (Leibrock, Ackermann et al. 2013). Our data in Akt3 KO mice, showing preserved normal glucose homeostasis and body weights (Easton, Cho et al. 2005, Tschopp, Yang et al. 2005), demonstrate an endophenotype reminiscent of schizophrenia, depression and anxiety. A more methodical behavioral study using all three KO mice is definitively required in order to further understand the specific role of each isoform. It is still remarkable to note that the three Akt isoforms do not exhibit identical functions. Another evidence for this contention is the fact that these KO mice studies demonstrate no compensatory upregulation of the remaining isoforms (assessed at the mRNA or protein levels). Correspondingly, our study reveals no effect of Akt3 deletions on the protein levels of Akt1 and Akt2 in the anterior cortex, striatum, hippocampus and cerebellum of Akt3 KO mice.

Our behavioral and electrophysiological observations on Akt3 KO mice suggest that Akt3 signaling may not play such an important role in hippocampal related functions. To begin with, normal spatial navigation and recognition memory are revealed in these mice using two independent tests, the Morris water maze and the object recognition. Many studies have highlighted the implication of the hippocampus as a part of the brain responsible for spatial navigation and recognition memory (Broadbent, Squire et al. 2004, Vann and Albasser 2011). It is therefore interesting that electrophysiological

measurements achieved in the hippocampal area CA1 of Akt3 KO mice are comparable to WT mice; which correlate nicely to the behavioral data. Since Akt3 KO mice exhibit normal performances at the Morris water maze, in the novel object recognition test and in four motor abilities tests, we believe that other brain functions, like motricity and motivation, are unaltered in Akt3 KO mice. This additional evidence further underscores the existence of a brain regional specificity of Akt3 function. Levels of phosphorylated GSK3, a known direct Akt molecular target, are robustly decreased in the hippocampus of Akt3 KO mice. Lower levels of GSK3 phosphorylation is well known to lead to enhanced GSK3 kinase activity and signalling (Freland and Beaulieu 2012). A previous study performed in knockin mice with serine-to-alanine mutations of GSK3 α/β , to block inhibitory serine-phosphorylation, confirms our results (Polter, Beurel et al. 2010). These GSK3 knockin mice display increased susceptibility to stress-induced depressive-like behaviors, whereas normal electrophysiological recording from the hippocampal area CA1 is shown. Altogether, these results suggest that while Akt3 deletion is associated with an endophenotype reminiscent of schizophrenia, anxiety and depression, the Akt3/GSK3 signaling has no influence in hippocampal area CA1 functions.

Akt3 deletion decreases GSK3 α phosphorylation at serine 21 and GSK3 β at serine 9 in every brain structure analysed in Akt3 KO mice, suggesting that the observed phenotype could be a consequence of altered GSK3 α/β phosphorylation. Since Akt can modulate over a hundred of known substrates (Manning and Cantley 2007), we cannot exclude that the observed phenotype in Akt3 KO mice may be associated with other signaling pathways. Nevertheless, impaired GSK3 α/β activity has been previously recognized to play a role in psychiatric conditions (Li and Jope 2010). For instance, previous publications have shown that anxiety and depressive-like behaviors are associated with decreased brain levels of phosphorylated GSK3 α/β (Polter, Beurel et al. 2010, Beurel, Song et al. 2011). Notably, in our experiments, the chronic lithium treatment known to amplified GSK3 α phosphorylation at serine 21 and GSK3 β at serine 9 (Mines, Yuskaitis et al. 2010, Liu, Chuang et al. 2011), is able to reverse the behavioral signs of anxiety and depression observed in Akt3 KO mice. Besides, we observe that lithium is returning back to control value the decreased phosphorylated levels of GSK3 α/β in the

Akt3 KO mice. Since lithium plasma concentrations measured were within the therapeutic range (0.4-1.2 mEq/L) and no relevant adverse effects were observed in mice fed with lithium (Malhi and Tanious 2011), we believe the administered doses of lithium are clinically relevant in our experimentations. The mechanism by which lithium amplified GSK3 α/β phosphorylation in Akt3 KO mice was unfortunately not assessed by our study. Lithium is a competitive inhibitor of magnesium and can directly inhibit Mg²⁺-ATP-dependent catalytic activity of GSK3. Alternatively, indirect GSK3 inhibition can be induced through the inhibition of the protein phosphatase-2A or by increasing Akt activity (Pan, Lewis et al. 2011, Frelan and Beaulieu 2012). In that regards, it was demonstrated that Akt1 isoform is essential for lithium to modulate mood-related behaviors in mice (Pan, Lewis et al. 2011). Protein levels of Akt1 are not affected in the Akt3 KO mice but it is still possible that the observed amplified GSK3 α/β phosphorylation is caused by an elevation of Akt1 activity. Additional biochemical experiments are definitively required to confirm this hypothesis. However, our data suggests that mechanisms underlying the lithium therapeutic effects are intact in Akt3 KO mice. They also confirm the implication of Akt3/GSK3 α/β pathway in the depressive and anxiety-like behaviors seen in these mice.

It is noteworthy that recent human genetic studies are in accord with our data and suggest that impaired Akt3 is associated with schizophrenia, depression and anxiety endophenotypes. In particular, Akt1 was originally identified as a potential schizophrenia susceptibility gene (Emamian, Hall et al. 2004). However, a recent multi-stage schizophrenia genome-wide association study of up to 36,989 cases and 113,075 controls did not reproduce this finding (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics 2014). They reported instead that only Akt3 represents a potential contributor to schizophrenia with a high risk factor of 64 out of 108 conservatively defined loci that meet genome-wide significance. Another argument is the fact that FXR1P, a direct molecular substrate of GSK3, has also been identify as a high schizophrenia risk factor (26/108) in this study. Notably, the study establishing FXR1P as a GSK3 substrate has also demonstrated the importance of these proteins interaction in the regulation of mood and emotion processing (Del'Guidice, Latapy et al. 2015). Altogether, our data paired with

these recent evidences raise the interesting possibility that Akt3 might play a pivotal role in human brain pathologies such as schizophrenia, depression and anxiety.

In conclusion, modeling of human neuropsychiatric disorders in rodents is extremely challenging. Progress in understanding key molecular target in order to develop new therapeutics would certainly benefit to this research field. Therefore, the involvement of the Akt3 isoform in mice behaviors related to schizophrenia and mood disorders is novel and highly relevant. We believe that further investigation on the Akt3 isoform could lead to a better understanding of the molecular basis implicated in neuropsychiatric diseases.

Conflict of interest statement

This research was conducted without any commercial or financial relationships that could be considered as a potential conflict of interest.

Author contributions

YB and MC designed the study. YB conducted this research. GB contributed for the behavioral experiments. M-ÉL-L conducted the electrophysiology experiments. YB and MC wrote the manuscript. EA provided the Akt3 KO mice. MC and GM contributed to the conceptual frame of the study and edited the manuscript

Acknowledgements

We thank Dr Morris J. Birnbaum for providing Akt3 KO mice. We are also grateful to François Fabi for helpful comments. This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Grant 311763-12) and the Canada Research Chair in Molecular Neuropharmacology. Y.B is the holder of a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada studentship.

References

- Balevich, E.C., Haznedar, M.M., Wang, E., Newmark, R.E., Bloom, R., Schneiderman, J.S., et al. (2015). Corpus callosum size and diffusion tensor anisotropy in adolescents and adults with schizophrenia. *Psychiatry Res* 231(3), 244-251. doi: 10.1016/j.psychres.2014.12.005.
- Balu, D.T., Carlson, G.C., Talbot, K., Kazi, H., Hill-Smith, T.E., Easton, R.M., et al. (2012). Akt1 deficiency in schizophrenia and impairment of hippocampal plasticity and function. *Hippocampus* 22(2), 230-240. doi: 10.1002/hipo.20887.
- Beaulieu, J.M., Gainetdinov, R.R., and Caron, M.G. (2009). Akt/GSK3 signaling in the action of psychotropic drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 49, 327-347. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.011008.145634.
- Bergeron, Y., Chagniel, L., Bureau, G., Massicotte, G., and Cyr, M. (2014). mTOR signaling contributes to motor skill learning in mice. *Front Mol Neurosci* 7, 26. doi: 10.3389/fnmol.2014.00026.
- Beurel, E., Song, L., and Jope, R.S. (2011). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 is necessary for the rapid antidepressant effect of ketamine in mice. *Mol Psychiatry* 16(11), 1068-1070. doi: 10.1038/mp.2011.47.
- Boland, E., Clayton-Smith, J., Woo, V.G., McKee, S., Manson, F.D., Medne, L., et al. (2007). Mapping of deletion and translocation breakpoints in 1q44 implicates the serine/threonine kinase AKT3 in postnatal microcephaly and agenesis of the corpus callosum. *Am J Hum Genet* 81(2), 292-303. doi: 10.1086/519999.
- Braff, D.L., Geyer, M.A., Light, G.A., Sprock, J., Perry, W., Cadenhead, K.S., et al. (2001). Impact of prepulse characteristics on the detection of sensorimotor gating deficits in schizophrenia. *Schizophr Res* 49(1-2), 171-178.
- Broadbent, N.J., Squire, L.R., and Clark, R.E. (2004). Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(40), 14515-14520. doi: 10.1073/pnas.0406344101.
- Chagniel, L., Bergeron, Y., Bureau, G., Massicotte, G., and Cyr, M. (2014). Regulation of tyrosine phosphatase STEP61 by protein kinase A during motor skill learning in mice. *PLoS One* 9(1), e86988. doi: 10.1371/journal.pone.0086988.
- Cho, H., Mu, J., Kim, J.K., Thorvaldsen, J.L., Chu, Q., Crenshaw, E.B., 3rd, et al. (2001). Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* 292(5522), 1728-1731. doi: 10.1126/science.292.5522.1728.

- Chung, B.K., Eydoux, P., Van Karnebeek, C.D., and Gibson, W.T. (2014). Duplication of AKT3 is associated with macrocephaly and speech delay. *Am J Med Genet A* 164A(7), 1868-1869. doi: 10.1002/ajmg.a.36521.
- Crawley, J.N. (2008). Behavioral phenotyping strategies for mutant mice. *Neuron* 57(6), 809-818. doi: 10.1016/j.neuron.2008.03.001.
- Del'Guidice, T., Latapy, C., Rampino, A., Khlghatyan, J., Lemasson, M., Gelao, B., et al. (2015). FXR1P is a GSK3beta substrate regulating mood and emotion processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(33), E4610-4619. doi: 10.1073/pnas.1506491112.
- Diez, H., Garrido, J.J., and Wandosell, F. (2012). Specific Roles of Akt iso Forms in Apoptosis and Axon Growth Regulation in Neurons. *Plos One* 7(4). doi: ARTN e32715 DOI 10.1371/journal.pone.0032715.
- Duman, R.S., and Voleti, B. (2012). Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents. *Trends in Neurosciences* 35(1), 47-56. doi: DOI 10.1016/j.tins.2011.11.004.
- Dummler, B., Tschopp, O., Hynx, D., Yang, Z.Z., Dirnhofer, S., and Hemmings, B.A. (2006). Life with a single isoform of Akt: mice lacking Akt2 and Akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies. *Mol Cell Biol* 26(21), 8042-8051. doi: 10.1128/MCB.00722-06.
- Easton, R.M., Cho, H., Roovers, K., Shineman, D.W., Mizrahi, M., Forman, M.S., et al. (2005). Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. *Mol Cell Biol* 25(5), 1869-1878. doi: 10.1128/MCB.25.5.1869-1878.2005.
- Emamian, E.S., Hall, D., Birnbaum, M.J., Karayiorgou, M., and Gogos, J.A. (2004). Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3beta signaling in schizophrenia. *Nat Genet* 36(2), 131-137. doi: 10.1038/ng1296.
- Freland, L., and Beaulieu, J.M. (2012). Inhibition of GSK3 by lithium, from single molecules to signaling networks. *Front Mol Neurosci* 5, 14. doi: 10.3389/fnmol.2012.00014.
- Garofalo, R.S., Orena, S.J., Rafidi, K., Torchia, A.J., Stock, J.L., Hildebrandt, A.L., et al. (2003). Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *J Clin Invest* 112(2), 197-208. doi: 10.1172/JCI16885.
- Gould, T.D., and Einat, H. (2007). Animal models of bipolar disorder and mood stabilizer efficacy: a critical need for improvement. *Neurosci Biobehav Rev* 31(6), 825-831. doi: 10.1016/j.neubiorev.2007.05.007.

- Hers, I., Vincent, E.E., and Tavaré, J.M. (2011). Akt signalling in health and disease. *Cell Signal* 23(10), 1515-1527. doi: 10.1016/j.cellsig.2011.05.004.
- Hsiung, S.C., Adlersberg, M., Arango, V., Mann, J.J., Tamir, H., and Liu, K.P. (2003). Attenuated 5-HT_{1A} receptor signaling in brains of suicide victims: involvement of adenylyl cyclase, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt and mitogen-activated protein kinase. *J Neurochem* 87(1), 182-194.
- Karege, F., Perroud, N., Burkhardt, S., Schwald, M., Ballmann, E., La Harpe, R., et al. (2007). Alteration in kinase activity but not in protein levels of protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 β in ventral prefrontal cortex of depressed suicide victims. *Biol Psychiatry* 61(2), 240-245. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.04.036.
- Krishnan, V., Han, M.H., Mazei-Robison, M., Iniguez, S.D., Ables, J.L., Vialou, V., et al. (2008). AKT signaling within the ventral tegmental area regulates cellular and behavioral responses to stressful stimuli. *Biol Psychiatry* 64(8), 691-700. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.06.003.
- Lai, W.S., Xu, B., Westphal, K.G., Paterlini, M., Olivier, B., Pavlidis, P., et al. (2006). Akt1 deficiency affects neuronal morphology and predisposes to abnormalities in prefrontal cortex functioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(45), 16906-16911. doi: 10.1073/pnas.0604994103.
- Laurier-Laurin, M.E., De Montigny, A., Attiori Essis, S., Cyr, M., and Massicotte, G. (2014). Blockade of lysosomal acid ceramidase induces GluN2B-dependent Tau phosphorylation in rat hippocampal slices. *Neural Plast* 2014, 196812. doi: 10.1155/2014/196812.
- Leibrock, C., Ackermann, T.F., Hierlmeier, M., Lang, F., Borgwardt, S., and Lang, U.E. (2013). Akt2 deficiency is associated with anxiety and depressive behavior in mice. *Cell Physiol Biochem* 32(3), 766-777. doi: 10.1159/000354478.
- Li, G., Anderson, R.E., Tomita, H., Adler, R., Liu, X., Zack, D.J., et al. (2007). Nonredundant role of Akt2 for neuroprotection of rod photoreceptor cells from light-induced cell death. *J Neurosci* 27(1), 203-211. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0445-06.2007.
- Li, X., and Jope, R.S. (2010). Is glycogen synthase kinase-3 a central modulator in mood regulation? *Neuropsychopharmacology* 35(11), 2143-2154. doi: 10.1038/npp.2010.105.
- Liu, Z.H., Chuang, D.M., and Smith, C.B. (2011). Lithium ameliorates phenotypic deficits in a mouse model of fragile X syndrome. *Int J Neuropsychopharmacol* 14(5), 618-630. doi: 10.1017/S1461145710000520.

- Malhi, G.S., and Tanious, M. (2011). Optimal frequency of lithium administration in the treatment of bipolar disorder: clinical and dosing considerations. *CNS Drugs* 25(4), 289-298. doi: 10.2165/11586970-000000000-00000.
- Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129(7), 1261-1274. doi: 10.1016/j.cell.2007.06.009.
- Mines, M.A., Yuskaitis, C.J., King, M.K., Beurel, E., and Jope, R.S. (2010). GSK3 influences social preference and anxiety-related behaviors during social interaction in a mouse model of fragile X syndrome and autism. *PLoS One* 5(3), e9706. doi: 10.1371/journal.pone.0009706.
- Murphy, B.P., Chung, Y.C., Park, T.W., and McGorry, P.D. (2006). Pharmacological treatment of primary negative symptoms in schizophrenia: a systematic review. *Schizophr Res* 88(1-3), 5-25. doi: 10.1016/j.schres.2006.07.002.
- Nellist, M., Schot, R., Hoogeveen-Westerveld, M., Neuteboom, R.F., van der Louw, E.J., Lequin, M.H., et al. (2015). Germline activating AKT3 mutation associated with megalencephaly, polymicrogyria, epilepsy and hypoglycemia. *Mol Genet Metab* 114(3), 467-473. doi: 10.1016/j.ymgme.2014.11.018.
- Nestler, E.J., and Hyman, S.E. (2010). Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 13(10), 1161-1169. doi: 10.1038/nn.2647.
- O'Brien, W.T., Harper, A.D., Jove, F., Woodgett, J.R., Maretto, S., Piccolo, S., et al. (2004). Glycogen synthase kinase-3 β haploinsufficiency mimics the behavioral and molecular effects of lithium. *J Neurosci* 24(30), 6791-6798. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4753-03.2004.
- Pan, J.Q., Lewis, M.C., Ketterman, J.K., Clore, E.L., Riley, M., Richards, K.R., et al. (2011). AKT kinase activity is required for lithium to modulate mood-related behaviors in mice. *Neuropsychopharmacology* 36(7), 1397-1411. doi: 10.1038/npp.2011.24.
- Poduri, A., Evrony, G.D., Cai, X., Elhosary, P.C., Beroukhi, R., Lehtinen, M.K., et al. (2012). Somatic activation of AKT3 causes hemispheric developmental brain malformations. *Neuron* 74(1), 41-48. doi: 10.1016/j.neuron.2012.03.010.
- Polter, A., Beurel, E., Yang, S., Garner, R., Song, L., Miller, C.A., et al. (2010). Deficiency in the inhibitory serine-phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 increases sensitivity to mood disturbances. *Neuropsychopharmacology* 35(8), 1761-1774. doi: 10.1038/npp.2010.43.

- Renoir, T. (2014). New frontiers in the neuropsychopharmacology of mental illness. *Front Pharmacol* 5, 212. doi: 10.3389/fphar.2014.00212.
- Riviere, J.B., Mirzaa, G.M., O'Roak, B.J., Beddaoui, M., Alcantara, D., Conway, R.L., et al. (2012). De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. *Nat Genet* 44(8), 934-940. doi: 10.1038/ng.2331.
- Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics, C. (2014). Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* 511(7510), 421-427. doi: 10.1038/nature13595.
- Tschopp, O., Yang, Z.Z., Brodbeck, D., Dummler, B.A., Hemmings-Mieszczak, M., Watanabe, T., et al. (2005). Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* 132(13), 2943-2954. doi: 10.1242/dev.01864.
- van Tol, M.J., van der Wee, N.J., van den Heuvel, O.A., Nielen, M.M., Demenescu, L.R., Aleman, A., et al. (2010). Regional brain volume in depression and anxiety disorders. *Arch Gen Psychiatry* 67(10), 1002-1011. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2010.121.
- Vann, S.D., and Albasser, M.M. (2011). Hippocampus and neocortex: recognition and spatial memory. *Curr Opin Neurobiol* 21(3), 440-445. doi: 10.1016/j.conb.2011.02.002.
- Vigo, D., Thornicroft, G., and Atun, R. (2016). Estimating the true global burden of mental illness. *Lancet Psychiatry* 3(2), 171-178. doi: 10.1016/S2215-0366(15)00505-2.
- Wang, D., Zeesman, S., Tarnopolsky, M.A., and Nowaczyk, M.J. (2013). Duplication of AKT3 as a cause of macrocephaly in duplication 1q43q44. *Am J Med Genet A* 161A(8), 2016-2019. doi: 10.1002/ajmg.a.35999.
- Wise, T., Radua, J., Via, E., Cardoner, N., Abe, O., Adams, T.M., et al. (2016). Common and distinct patterns of grey-matter volume alteration in major depression and bipolar disorder: evidence from voxel-based meta-analysis. *Mol Psychiatry*. doi: 10.1038/mp.2016.72.
- Wittchen, H.U., Jacobi, F., Rehm, J., Gustavsson, A., Svensson, M., Jonsson, B., et al. (2011). The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol* 21(9), 655-679. doi: 10.1016/j.euroneuro.2011.07.018.

- Wright, I.C., Rabe-Hesketh, S., Woodruff, P.W., David, A.S., Murray, R.M., and Bullmore, E.T. (2000). Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 157(1), 16-25.
- Yang, Z.Z., Tschopp, O., Baudry, A., Dummler, B., Hynx, D., and Hemmings, B.A. (2004). Physiological functions of protein kinase B/Akt. *Biochem Soc Trans* 32(Pt 2), 350-354. doi: 10.1042/.
- Yang, Z.Z., Tschopp, O., Hemmings-Mieszczak, M., Feng, J., Brodbeck, D., Perentes, E., et al. (2003). Protein kinase B alpha/Akt1 regulates placental development and fetal growth. *J Biol Chem* 278(34), 32124-32131. doi: 10.1074/jbc.M302847200.

Figure legends

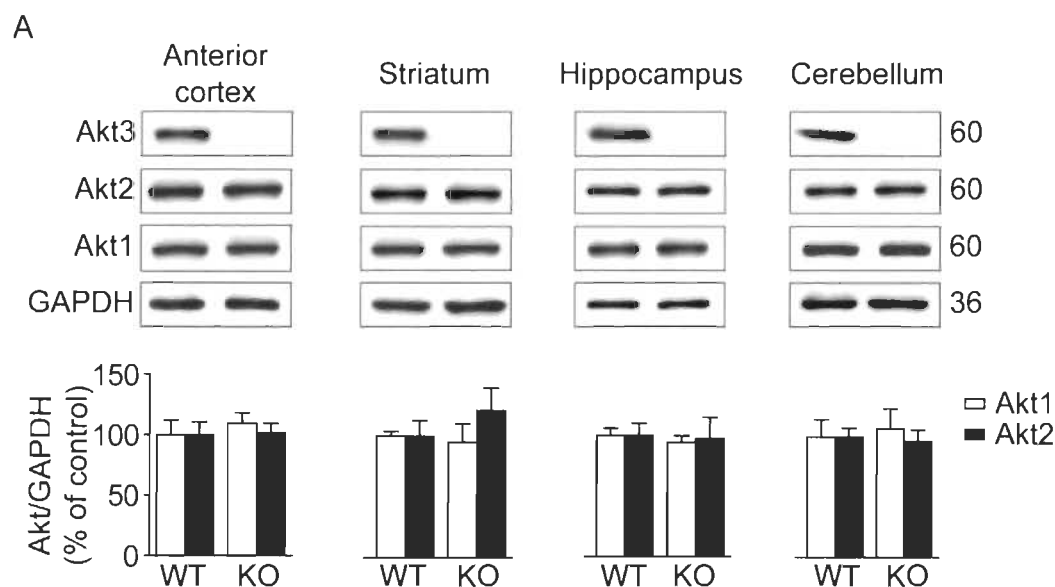


Figure 1 Levels of Akt isoforms in the Akt3 KO mouse brain.

(A) Levels of Akt1, Akt2 and Akt3 were assessed by western blot in the anterior cortex, striatum, hippocampus and cerebellum. The data, expressed relative to GAPDH, represent the mean of relative optical density of Akt1 and Akt2 (expressed as a percentage of control values) \pm SEM, $n = 3-4$; triplicate experiments for each mouse/group. Since Akt3 protein was undetectable in Akt3 KO mice, we did not quantify the optical density.

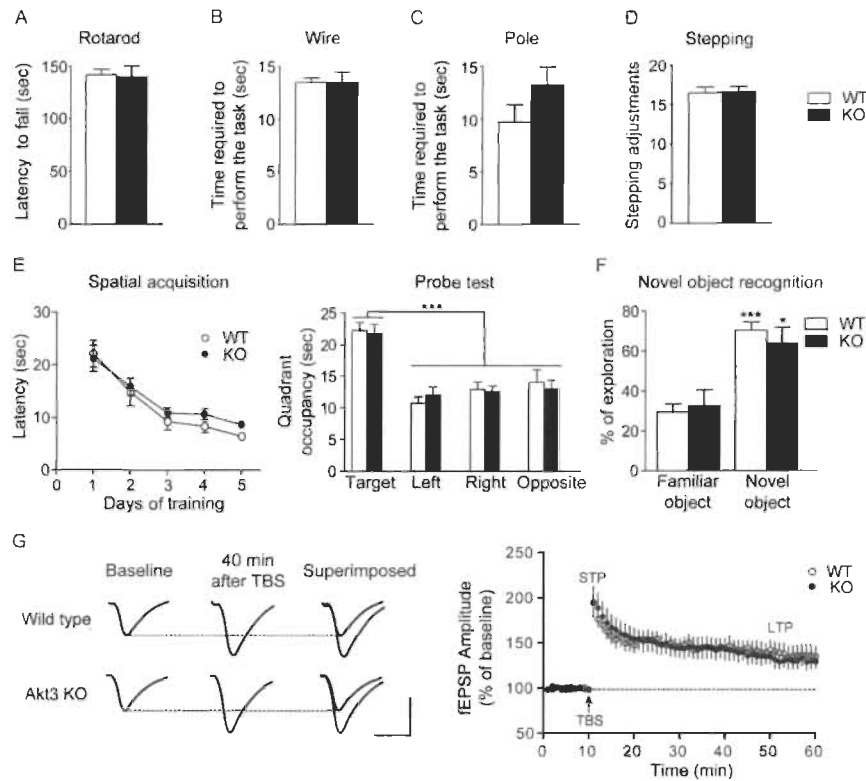


Figure 2 Normal motor abilities and cognitive functions in Akt3 KO mice.

Motor abilities on the (A) Rotarod, (B) Pole, (C) Wire and (D) stepping tests of Akt3 KO and wild type (WT) mice were evaluated. Data represent the average mean latency to fall expressed in seconds from 3 assays (rotarod) \pm SEM, $n = 7$ mice/group. Data represent the mean time required to perform the test (pole and wire) and the mean numbers of adjusting steps (stepping) \pm SEM, $n = 6-7$ mice/group. (E) Mice were trained on the Morris water maze. Spatial acquisition is evaluated by the latency to reach the hidden platform at each day of training expressed in seconds \pm SEM, $n = 12-17$ mice/group. Memory is evaluated during the probe trial by the time spent in each quadrant expressed in seconds \pm SEM, $n = 12-17$ mice/group. *** $p < 0.001$ vs. target quadrant. (F) The novel object recognition test was performed to evaluate memory. Time spent exploring the familiar or the novel object is shown as a ratio of the total time spent exploring both objects \pm SEM, $n = 10-11$ mice/group. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. familiar object. (G) Examples of average fEPSPs elicited in the stratum radiatum before and after theta-burst stimulation in WT and Akt3 KO slices. Each sample trace is an average of 5 consecutive responses. Calibration bar: 5ms; 1mV. Amplitude of fEPSPs was measured before and after theta-burst stimulation and fEPSPs were expressed as the percentage of the average response before theta-burst stimulation (arrow). The values obtained during the period preceding theta-burst stimulation were averaged to derive baseline value. The data are expressed as percentages of baseline values and each point represents the mean \pm SEM, $n = 7$.

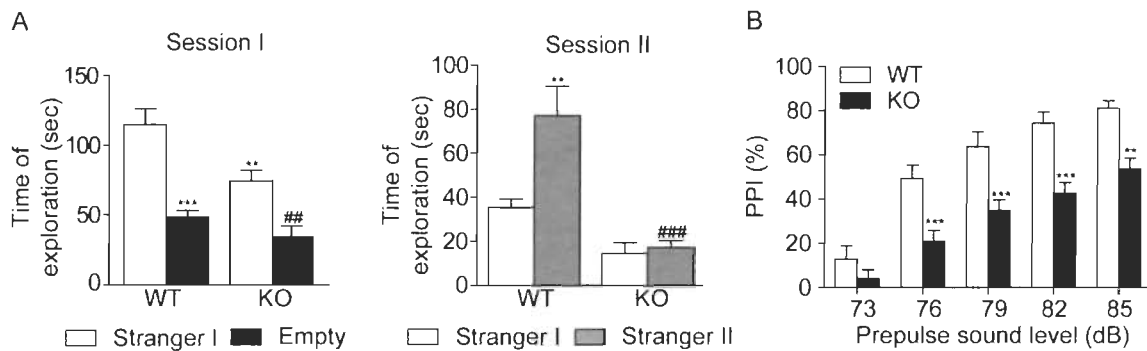


Figure 3 Decreased social behaviors and impaired sensorimotor gating in Akt3 KO mice.

Social behavior and social novelty were examined in the three-chamber sociability test. **(A)** On session I, sociability was evaluated by the time Akt3 KO and WT mice were exploring the stranger mouse (stranger I) and the empty cage. Data represent the mean time of exploration expressed in seconds \pm SEM, $n = 8 - 11$ mice/group. $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ vs. exploration of stranger mouse I by WT mice; $##P < 0.01$ vs. exploration of stranger mouse I by Akt3 KO. On session II, preference for social novelty was evaluated by comparing the time mice explored the familiar stranger mouse I and the novel stranger mouse II. Data represent the mean exploration time expressed in seconds \pm SEM, $n = 8-11$ mice/group. $**p < 0.01$ vs exploration of stranger mouse I by WT mice, $###p < 0.001$ vs. exploration of stranger mouse II by WT mice. **(B)** Sensorimotor gating was evaluated by measuring the level of prepulse inhibition for different prepulse intensities. Data represent the mean percentage \pm SEM, $n = 11-12$ mice/group. $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ vs. WT mice.

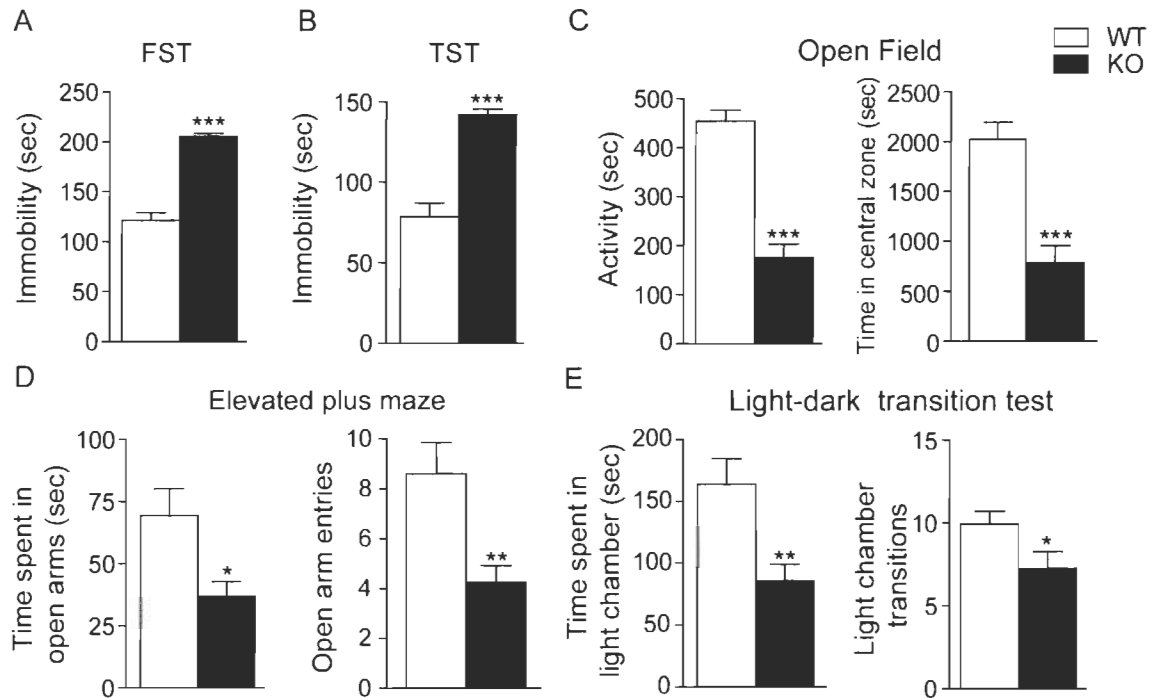


Figure 4 Depressive and anxiety-like behaviors in Akt3 KO mice.

Depressive-like behaviors were evaluated by measuring the immobile time of Akt3 KO mice and WT mice in (A) the forced swim test and (B) the tail suspension test. (C) In the open field, anxiety-like behavior was based on mice activity and distance traveled in the central zone. (D) In the elevated plus maze, time in open arms and number of entries in open arms were measured. (E) In the light-dark test, time spent in the light chamber and number of entries in the light chamber was measured. All data are expressed as the mean ± SEM, $n = 11-17$ mice/group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. WT mice.

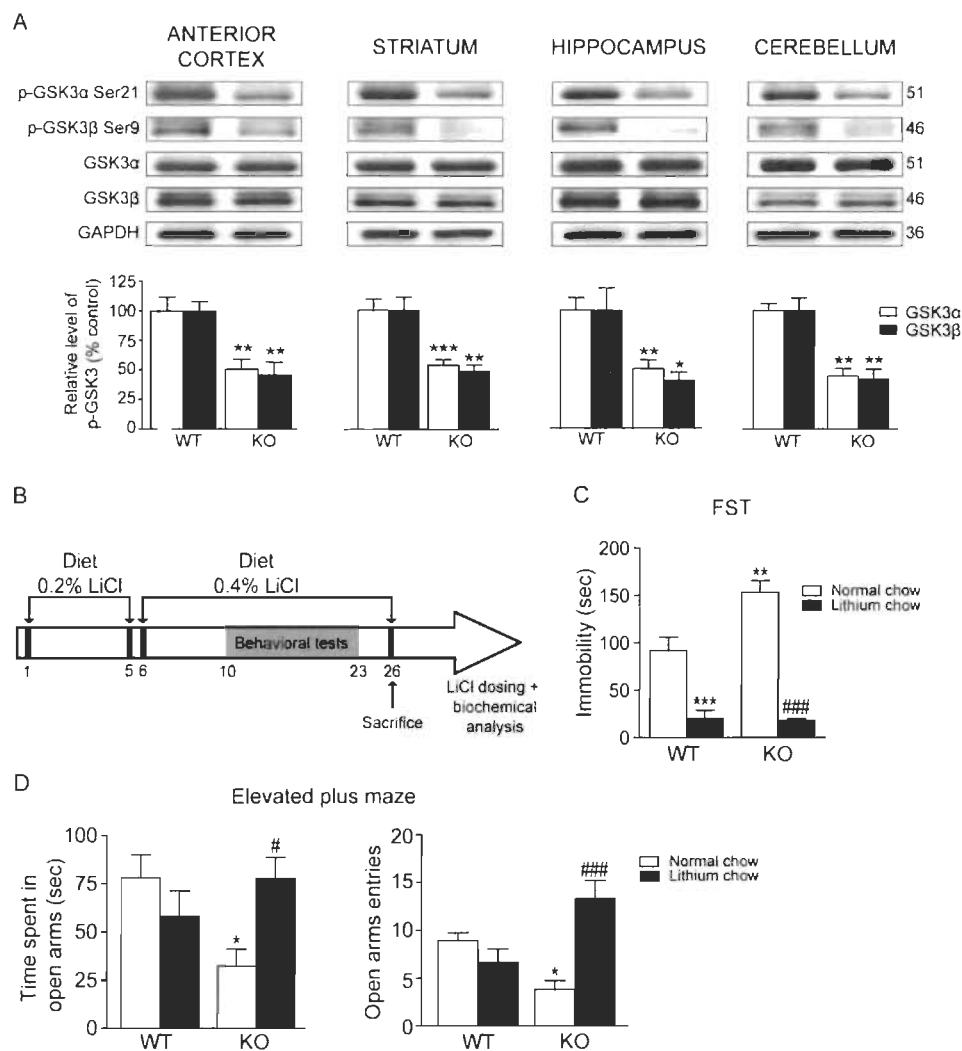


Figure 5 Chronic lithium treatment reversed depressive and anxiety-like behaviors in Akt3 KO mice.

(A) Levels of phosphorylated GSK3α/β were evaluated by western blot in the anterior cortex, striatum, hippocampus and cerebellum of Akt3 KO and WT mice. The data, expressed relative to total GSK3α/β, represent the mean of relative optical density (expressed as a percentage of control values) \pm SEM, $n = 3$ mice/group; triplicate experiments for each mouse/group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. WT. (B) Experimental design of chronic lithium treatment. (C) Depressive-like behavior was evaluated by the forced swim test after normal or lithium diet. Data express the mean time of immobility in seconds \pm SEM, $n = 6-12$ mice/group. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. WT fed with normal chow, ### $p < 0.001$ vs. Akt3 KO mice fed with normal chow. (D) Anxiety-like behavior was evaluated in the elevated plus maze after normal or lithium diet. Data are expressed as the mean \pm SEM, $n = 10-12$ mice/group. * $p < 0.05$ vs. WT fed with normal chow, # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ vs. Akt3 KO mice fed with normal chow.

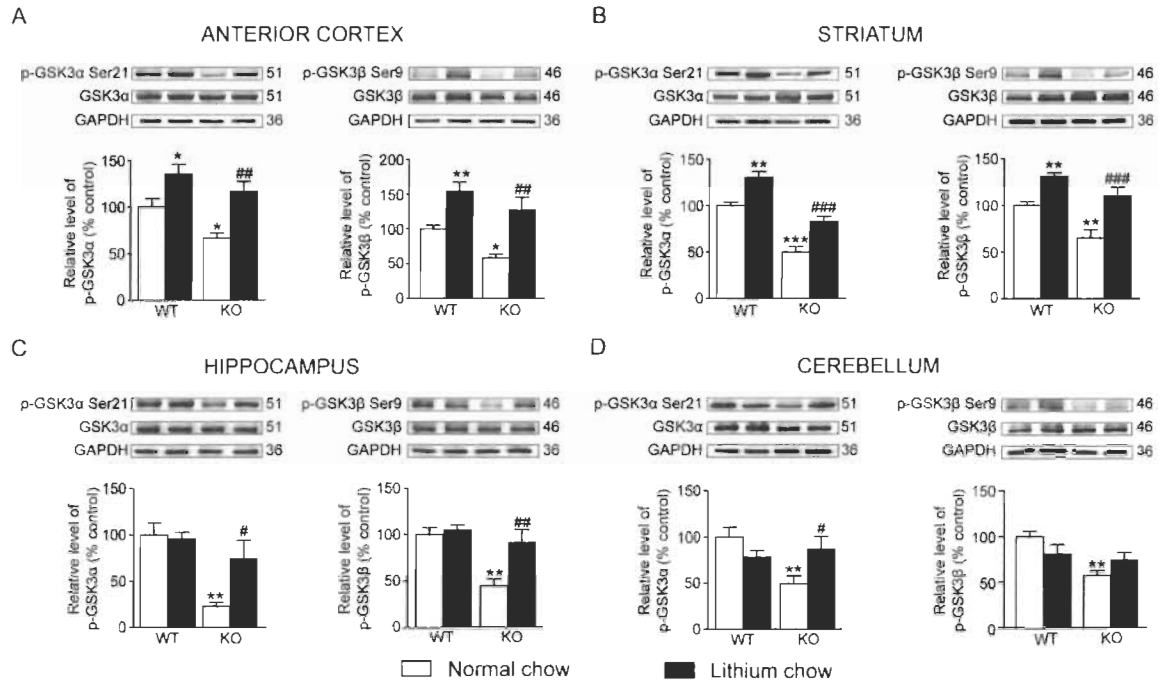


Figure 6 Chronic lithium treatment increased the levels of phosphorylated GSK3α/β in Akt3 KO mice.

At the end of the chronic lithium treatment, levels of phosphorylated GSK3α/β were measured by western blot in the (A) anterior cortex, (B) striatum, (C) hippocampus and (D) cerebellum. The data, expressed relative to total GSK3α/β level, represent the mean of relative optical density of phosphorylated GSK3α/β (expressed as a percentage of control values) \pm SEM, $n = 4-8$ mice/group for each condition; triplicate experiments for each mouse/group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. WT fed with normal chow, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. Akt3 KO mice fed with normal chow.

CHAPITRE V

MTOR SIGNALING CONTRIBUTES TO MOTOR SKILL LEARNING IN MICE

Le contenu de ce chapitre a fait l'objet d'une publication en anglais dans la revue « *Frontiers in Molecular neuroscience* ». La référence de cet article est la suivante :

Bergeron Y., Chagniel L., Bureau G., Massicotte G. et Cyr M. (2014) "mTOR signaling contributes to motor skill learning in mice", *Front. Mol. Neurosci.* 7:26.

DOI: 10.3389/fnmol.2014.00026

5.1 Contribution des auteurs

Les travaux présentés ont été réalisés par Yan Bergeron, sous la supervision du Dr Michel Cyr. La création du projet et des expériences ont été réalisées par Yan Bergeron sous l'expertise du Dr Michel Cyr. Les expériences ont été réalisées par Yan Bergeron avec l'aide technique pour les expériences *in vivo* de Laure Chagniel (étudiante au doctorat) et Geneviève Bureau (auxiliaire de recherche). Le matériel et les produits ont été fournis par les laboratoires des Drs Guy Massicotte et Michel Cyr. L'analyse et l'interprétation des résultats ont été réalisées par Yan Bergeron sous la supervision des Drs Guy Massicotte et Michel Cyr. Yan Bergeron a écrit le manuscrit en collaboration avec le Dr Michel Cyr.

5.2 Résumé de l'article (français)

La protéine mTOR est une kinase importante à la régulation de la synthèse des protéines et est associée à différentes formes de mémoire ainsi qu'à la plasticité synaptique. Cependant, son rôle dans l'exécution du mouvement ainsi qu'à la mémorisation d'une nouvelle tâche motrice complexe n'est pas encore connu. Ainsi, cette étude vise à comprendre, chez la souris, l'implication de la protéine mTOR dans les processus moléculaires des habiletés motrices ainsi que de l'apprentissage moteur par l'intermédiaire du rotarod. Dans un premier temps, nous avons remarqué une modulation différentielle du niveau de phosphorylation de la protéine mTOR dans le striatum, l'hippocampe, le cervelet et le cortex antérieur en fonction des phases d'apprentissage de la tâche motrice complexe. Dans un deuxième temps, nous avons inhibé la protéine mTOR de manière pharmacologique et génétique, soit par injection systémique et intrastriatale de rapamycine ou soit par infusion d'un siRNA visant mTOR au striatum dorsal. L'inhibition de la protéine mTOR altère les performances au rotarod spécifiquement dans la phase liée à la consolidation de l'apprentissage moteur. Des expériences subséquentes illustrent que l'inhibition de la protéine mTOR n'a pas d'effet sur les habiletés motrices, suggérant un rôle spécifique à l'apprentissage moteur et non à l'exécution motrice. Finalement, nous démontrons que l'activité de mTORC1, via P70S6K et 4EBP1, est une voie de signalisation moléculaire importante à la consolidation d'une nouvelle tâche motrice complexe.

5.3 Deuxième article scientifique :

mTOR signaling contributes to motor skill learning in mice

Abstract

The mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase is a critical regulator of mRNA translation and is suspected to be involved in various long lasting forms of synaptic and behavioural plasticity. However, its role in motor learning and control has never been examined. This study investigated, in mice, the implication of mTOR in the learning processes associated with the accelerating rotarod task. We first observed that the rotarod learning did not alter the levels of total mTOR in the striatum, hippocampus, cerebellum and anterior cortex of trained mice. However, it increased the levels of phosphorylated mTOR in the striatum and hippocampus exclusively during the first session of training; no change was observed at the second and third sessions. In order to further investigate the potential role of mTOR during motor skill learning, we performed systemic and intrastriatal inhibitions of mTOR using the pharmacological inhibitor rapamycin, as well as a genetic knockdown of striatal mTOR using intrastriatal infusion of mTOR siRNA. These three independent approaches were all associated with a significant reduction in rotarod performances that were reminiscent of impaired consolidation processes. Notably, these treatments did not affect the capacity of mice to execute the pole test, suggesting that mTOR activity was mainly controlling motor learning rather than motor abilities. Moreover, all treatments decreased the levels of phosphorylated 4EBP1 and P70S6K, two molecular downstream targets of mTORC1. Our findings demonstrate that striatal mTOR kinase, via the phosphorylation of 4EBP1 and P70S6K, plays an important role in the cellular and molecular processes involved in motor skill learning.

Introduction

When faced to new learning experiences, one fascinating characteristic of the brain is its capacity to modulate neural activities and induced long-lasting modifications in neural circuits. These modifications subsequently influence thoughts, feelings and behaviors (Citri and Malenka, 2008). In the case of motor control and learning, it is known that brain areas such as the basal ganglia, motor cortex and cerebellum cooperate to enable movement (Lynch, 2004). Recent investigations have shown regional-specific changes in neural activity and morphology during the acquisition of motor tasks in the striatum, a major nucleus input of the basal ganglia (Packard and Knowlton, 2002; Kreitzer and Malenka, 2008). For example, it is believed that the dorsal area of the striatum plays a significant role in the learning processes of motor skilled tasks (Costa et al., 2004). However, the molecular mechanism responsible for the long-lasting modifications in the dorsal striatum during motor learning is still under extensive investigations.

Interestingly, the mammalian target of rapamycin (mTOR) activity has been noticed to be essential in neuronal development, translation of several mRNAs and synaptic plasticity (Bekinschtein et al., 2007; Swiech et al., 2008; Belevsky et al., 2009; Richter and Klann, 2009). This serine/threonine kinase forms two complexes, mTORC1 and mTORC2. The first complex plays a major role in regulating critical cellular processes such as cell growth, proliferation, transcription, protein synthesis as well as ribosomal biogenesis by phosphorylating P70S6K and eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E)-binding proteins (4EBPs) (Sarbasov et al., 2005; Wang and Proud, 2006; Hoeffler and Klann, 2009; Urbanska et al., 2012). The second complex is involved in cytoskeletal organization (Jacinto et al., 2004; Sarbasov et al., 2006). Recently, it has been demonstrated that molecular pathways involving mTOR activity are essential for the long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) (Gkogkas et al., 2010; Garelick and Kennedy, 2011). Furthermore, behavioral experiments investigating spatial learning, object recognition and inhibitory avoidance memory have recognized a role for mTOR activity (Qi et al., 2010; Jobim et al., 2011a; Jobim et al., 2011b). Whether mTOR activity is influenced or engaged during the execution of motor movement and motor learning is totally unknown.

The present study establishes, by using two different pharmacological and one genetic approaches, that mTOR activity of the dorsal striatum is one important molecular step involved in learning consolidation, but not motor abilities, during the acquisition of a complex motor skill in mice. Notably, we demonstrate the implication of two downstream targets of mTORC1 activation, P70S6K and 4EBP1, in this process.

Materials and methods

Animals

C57bl/6j male mice of 60 to 75 days old (Charles River, St-Constant, Qc, Canada) were used. They were individually housed in a controlled room (light cycle: 14 h; dark cycle: 10 h) with *ad libitum* access to water and food. All experiments and procedures were approved by the UQTR Institutional Animal Care and Use Committee and performed in accordance with the Canadian Council on Animal Care.

Rotarod

To assess motor skill learning, we used the accelerating rotarod. Mice performances on the rotarod (AccuScan Instruments, Columbus, OH, USA), which accelerates from 4 to 40 rpm in 300 s, were evaluated for 10 trials per session on three consecutive days. A resting time of 180 s was allowed between each trial. The end of a trial was considered when mice were falling off the rod or when they reached 300 s. Latency to fall was recorded for each trial.

Pole test

The pole test was performed before the first trial of the third rotarod training day, 15 min after the systemic or intrastriatal rapamycin injections or at the 14th day of siRNA infusion. Briefly, the pole test consist of a vertical rod (Diameter: 1.5 cm; Length: 50 cm) fixed on a table with a tennis ball at its upper end. Mice were placed on the upper end of

the rod facing the tennis ball. The time required for each mouse to turn around and descend the vertical rod was recorded. A maximum time of 120 s was allowed to execute the task. To make sure they fully learned the motor task before the recorded test, mice were pre-trained three consecutive times.

Pharmacological treatments

For systemic treatment, mice were weighed and systemically injected with vehicle (100% DMSO, 180 to 210 μ l) or rapamycin (40 mg/kg, dissolved in 100% DMSO, 180 to 210 μ l) (LC laboratories, Woburn, MA, USA) 15 min prior each rotarod training days (Figure 1A). In order to discriminate motor endurance activity from motor skill learning, an independent cohort of mice were trained on the accelerating rotarod for four consecutive days. At the fourth day, mice received systemic injections of rapamycin or the vehicle before the beginning of the first trial. For intrastriatal treatment, mice were anesthetized under isoflurane, placed in a stereotaxic apparatus and implanted with a bilateral 26-gauge guide cannula (Plastics One, Roanoke, VA, USA). The coordinates used for the cannula implantation were: AP: +0.86 mm; ML \pm 1.50 mm; DV: -3.25 mm relative to Bregma (Atlas of Paxinos and Franklin, 2001). After the surgery, seven days of recovery were given to the mice before starting the experiments. A dummy cannula (Plastics One, Roanoke, VA, USA) was left in place throughout the experiment. Under anesthesia, 15 min prior the first trial of each rotarod training days, the dummy cannula was replaced by the injector. Injection of vehicle (100% DMSO, 1 μ l/side) or rapamycin (1 ng/1 μ l/side, dissolved in 100% DMSO) (LC laboratories, Woburn, MA, USA) was delivered into the dorsal striatum of both hemispheres at a constant flow of 0.5 μ l/min by the micro injector pump (Harvard Apparatus, Montréal, Qc, Canada) (Figure 1B).

siRNA knockdown

Mice were anesthetized under isoflurane and positioned in a stereotaxic frame. A bilateral connector cannula (Plastics One) was installed into the dorsal striatum at the

following coordinates: AP: +0.86 mm; ML: ± 1.50 mm; DV: -3.25 mm relative to Bregma (Atlas of Paxinos and Franklin, 2001). It was kept in place with Loctite instant adhesive. Two osmotic mini-pumps (Alzet, Cupertino, CA, USA, Model 1002) were surgically placed subcutaneously on each side of the scapulae and connected to the cannula via a plastic connector. Osmotic pumps were prefilled with either distilled/deionized water DNase/RNase free (EMD Millipore, 6 μ l/day) or mTOR siRNA (1.44 nmol/day, diluted in 100% ddH₂O DNase/RNase free, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, CANADA) and mice were receiving a continuous intrastriatal infusion for 14 consecutive days. Mice were trained on the rotarod on the 12th, 13th and 14th days of treatment (Figure 1C).

Western blot analysis

In all cases, mice were sacrificed 15 min after the last trial of their last rotarod training day and brains were immediately removed. The striatum, hippocampus, cerebellum and anterior cortex were dissected, frozen on dried ice and preserved at -80°C. Protein extractions of each structure were made by homogenizing the tissue in a solution of RIPA buffer containing 65mM Tris base, 0.15M NaCl, 0.1% Triton-100x, 0.25% SDS, 1mM EDTA and protease/phosphatase inhibitors cocktail (Roche, Indianapolis, IN, USA). The Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was used to evaluate protein concentrations. Samples of loading buffer, water and 40 μ g of proteins were boiled at 95°C for 5 min, then loaded on 8, 10 or 15% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Afterward, membranes were blocked in 5% BSA/TBS-Tween 0.1% for 1 h at room temperature and incubated overnight at 4°C with the primary antibodies diluted in 1% BSA/TBS-Tween 0.1%. Antibodies were raised against phosphorylated mTOR at serine 2448 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA, 1:1000), total mTOR (Cell signaling, 1:1000), which recognized at the same time mTORC1 and mTORC2, phosphorylated P70S6K at threonine 389 (Cell signaling, 1:1000), total P70S6K (Cell signaling, 1:1000), phosphorylated 4EBP1 at threonine 37 and 46 (Cell signaling, 1:1000), total 4EBP1 (Cell signaling, 1:1000) and GAPDH (Abcam, Cambridge, MA, USA 1:20000). Membranes were washed and incubated with corresponding anti-mouse or anti-rabbit secondary horseradish peroxidase antibodies

(Cell signaling, 1:5000) diluted in 1% BSA/TBS–Tween 0.1% for 1 h at room temperature. To visualize protein bands, chemiluminescence reactions were used (SuperSignal West Femto chemiluminescence kit, Pierce Chemical Co, Rockford, IL, USA). Quantification was performed using the Visonwork LS software (UVP bioimaging Upland, CA, USA) and analyses of densitometry were expressed as relative optical density.

Statistical analysis

Data were analysed with GraphPad Prism software (version 5.0, Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Statistical analysis was determined by unpaired Student's *t* test, one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls *post hoc* test or two-way repeated-measures ANOVA followed by the Bonferroni *post hoc* test. Data are shown as the mean \pm SEM and statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Rotarod learning induced mTOR activation

As we previously published, the rotarod task illustrates the typical phases of motor skill learning (Bureau et al., 2010). At the first day of training, mice enhanced rapidly their performance over each trial corresponding to the early phase of learning. At the second day, mice still improved their scores but to a much lower extent, finally reaching a plateau on the third rotarod training day. The second and third days of rotarod training illustrates the consolidation phase of learning (Figure 2A).

In order to determine whether mTOR was activated during rotarod training, levels of total mTOR as well as levels of phosphorylated mTOR at serine 2448 were assessed at days 1, 2 and 3 in the striatum, hippocampus, anterior cortex and cerebellum. One-way ANOVA followed by the Newman–Keuls *post hoc* test was performed. At the first day of rotarod training, levels of phosphorylated mTOR were significantly increased in the

striatum ($F_{(3,15)} = 6.17$, $P < 0.01$) and hippocampus ($F_{(3,15)} = 4.29$, $P < 0.05$), but were equal to those of untrained mice at the second and third days of training (Figures 2B, C). Levels of phosphorylated mTOR in the anterior cortex ($F_{(3,11)} = 0.84$, $P = 0.51$) and cerebellum ($F_{(3,15)} = 0.17$, $P = 0.9131$) of trained mice were not significantly different to the untrained mice at any training day (Figures 2D, E). In all brain structures studied, levels of total mTOR were unaffected by rotarod training (Figures 2B–E).

Effect of systemic and intrastriatal inhibition of mTOR on rotarod learning

To investigate whether mTOR activity is involved in the learning of a complex motor task, the mTOR inhibitor rapamycin was systemically injected in mice before every single rotarod training. It is noteworthy that it was previously believed that a rapamycin treatment could discriminate mTORC1 and mTORC2 (mTORC2 was considered rapamycin-resistant), but recent studies recognized that rapamycin inhibited both complexes (Lamming et al., 2012). On the first training day, we observed a rapid improvement of performances in both rapamycin-treated and control mice. However, on the second and third day, the performances of rapamycin-treated mice were significantly lower than control mice (Figure 3A). Statistical analysis of the two first and two last trials of each training session were achieved using a two-way repeated measures ANOVA followed by the Bonferroni *post hoc* test. Analysis of the first trials displayed a significant difference in treatments ($F_{(1,34)} = 7.54$, $P < 0.05$), an effect of training days ($F_{(2,34)} = 57.95$, $P < 0.001$) and an interaction between treatments and training days ($F_{(2,34)} = 4.23$, $P > 0.05$; Figure 3A). Analysis of the last trials indicated a significant effect of treatment ($F_{(1,34)} = 6.96$, $P < 0.05$), training days ($F_{(2,34)} = 21.63$, $P < 0.001$) as well as an interaction between treatments and training days ($F_{(2,18)} = 3.53$, $P > 0.05$; Figure 3A).

We next investigated the effect of mTOR inhibition directly in the dorsal striatum of mice during the rotarod learning. We observed that performances of rapamycin-treated and control mice were similar to those obtained with the systemic approach (Figure 3B). Statistical analysis of the two first trials revealed a significant difference in treatments ($F_{(1,18)} = 12.24$, $P < 0.01$) and an effect of training days ($F_{(2,18)} = 42.31$, $P < 0.001$),

but no interaction between the treatments and the training days ($F_{(2,18)} = 0.50$, $P > 0.05$; Figure 3B). Analysis of the two last trials indicated a significant effect of treatment ($F_{(1,18)} = 21.07$, $P < 0.01$) and training days ($F_{(2,18)} = 19.27$, $P < 0.001$), although no interaction between the treatments and the training days was observed ($F_{(2,18)} = 3.45$, $P > 0.05$); Figure 3B).

To investigate the effect of systemic rapamycin injections on motor activity endurance, mice were trained on the rotarod during four days, including 10 assays per day. At the fourth day, mice were treated with a systemic injection of either vehicle or rapamycin. No difference was observed in rotarod performances between rapamycin and vehicle-treated mice. Statistical analysis, using a two-way repeated measures ANOVA followed by the Bonferroni *post hoc* test, revealed no significant difference in treatments ($F_{(1,15)} = 0.03$, $P > 0.05$), a significant effect in training days ($F_{(3,15)} = 23.57$, $P < 0.001$) and no interaction between treatments and training days ($F_{(3,15)} = 0.22$, $P > 0.05$; Figure 4A). To verify whether the systemic or intrastriatal rapamycin treatments interfered with motor abilities, the pole test was performed. A similar amount of time was required to perform the task in systemic (Unpaired *t*-test, $P = 0.38$) and intrastriatal (Unpaired *t*-test, $P = 0.78$) rapamycin-treated mice compared to their respective control (Figure 4B).

Rapamycin treatments reduced the levels of phosphorylated P70S6K and 4EBP1 in the striatum

The levels of P70S6K and 4EBP1, two mTORC1 downstream substrates, as well as the levels of their phosphorylated form were evaluated following rapamycin treatments. We observed that the levels of phosphorylated P70S6K at Thr389 (Unpaired *t*-test, $P < 0.01$) and 4EBP1 at Thr37/46 (Unpaired *t*-test, $P < 0.001$) were strongly reduced after the intraperitoneal rapamycin treatments (Figures 5A, B). Likewise, levels of phosphorylated P70S6K (Unpaired *t*-test, $P < 0.001$) and 4EBP1 (Unpaired *t*-test, $P < 0.001$) were reduced after the intrastriatal rapamycin treatments (Figures 5C, D). Interestingly, both treatments did not affect the levels of total P70S6K and 4EBP1 (Figures 5A–D).

Intrastriatal infusion of mTOR siRNA altered rotarod learning and decreased the phosphorylation levels of striatal mTORC1 downstream substrates

In order to further confirm the implication of mTOR in motor skill learning, we infused directly into the dorsal striatum a specific mTOR siRNA during 14 consecutive days. On the 12th, 13th and 14th days, we assessed the latency to fall on the accelerating rotarod. During the first day of training, there were no difference in the performances of siRNA and vehicle-treated mice. However, performances of the siRNA-treated mice were lower on the second and third day, when compared to their respective controls (Figure 6A). Statistical analyses of the two first and the two last trials of every rotarod training day were performed using a two-way repeated measures ANOVA followed by the Bonferroni *post hoc* test. The analysis of the two first trials revealed no significant difference in treatments ($F_{(1,10)} = 1.89$, $P > 0.05$), a significant effect in training days ($F_{(2,10)} = 23.08$, $P < 0.001$) and no interaction between treatments and training days ($F_{(2,10)} = 1.26$, $P > 0.05$; Figure 6A). However, statistical analysis of the two last rotarod trials displayed a significant effect of siRNA treatment ($F_{(1,10)} = 24.41$, $P < 0.01$) and training days ($F_{(2,10)} = 12.37$, $P < 0.01$), although no interaction between siRNA treatment and training days was observed ($F_{(2,10)} = 1.7$, $P > 0.05$; Figure 6A). The siRNA-treated mice were also tested with the pole test and no significant difference between these mice and the vehicle-treated mice was observed (Unpaired t-test, $P = 1.00$; Figure 6B).

The effect of siRNA infusion in the levels of striatal mTOR and its downstream targets P70S6K and 4EBP1 were verified. We observed that levels of total mTOR were decreased by ~25% in the siRNA-treated mice when compared to vehicle-treated mice (Unpaired t-test, $P < 0.01$; Figure 7A). This result confirmed that our experiment design was sound considering that previous work using siRNA injections in the striatum of a living mouse revealed a reduction of the targeted proteins within the range of 40% (Thakker et al., 2004). Interestingly, levels of phosphorylated P70S6K (Unpaired t-test, $P < 0.01$) and 4EBP1 (Unpaired t-test, $P < 0.05$) were also significantly decreased compared to vehicle-treated mice (Figures 7B, C). No difference in levels of total P70S6K and 4EBP1 was observed in both groups of mice (Figures 7A–C).

Discussion

At the behavioural level, our study demonstrates that inhibition of mTOR activity impaired significantly motor learning. We believe these effects on motor behavior are reminiscent of a learning deficit as our findings argue against a role of mTOR in motor capacity. The first evidence is the fact that a reduced mTOR activity does not affect the performances of mice at the pole test. In addition, peripheral rapamycin injections in mice that have fully learned the accelerating rotarod task have no effect. This particular finding is supported by a previous study demonstrating that systemic administrations of rapamycin do not affect mice performances when they are pre-trained on the rotarod (Deli et al., 2012). Moreover, the fact that both systemic and intrastriatal treatments lead to similar results suggests that possible effects of mTOR inhibition on peripheral functions such as muscles strength are unlikely. It is noteworthy that motor skill learning is assumed to be the major component responsible for the improvement in performance observed during rotarod training. The distinctive characteristic of the rotarod task is its independence to reward, spatial and instrumental features (Buitrago et al., 2004; Luft and Buitrago, 2005). Falling off the rod may represent a weak aversive stimulus. However, the distance to fall is small (40 cm) and we avoid additional aversive stimuli such as electric shocks. Taken together, it becomes evident that mTOR activities do not alter motor capacity but rather govern motor skill learning.

Our data demonstrate a differential involvement of brain structures during the acquisition of the rotarod task. In the striatum and hippocampus, mTOR activity is enhanced during the first day of rotarod training whereas no effect is noticed in the anterior cortex or the cerebellum. This is somewhat intriguing because these two last structures are also known to be engaged during the learning of a complex motor skill (Doyon and Benali, 2005; Bureau et al., 2010). We, and other groups, have previously documented that the participation of specific molecular pathways in motor skilled learning are differentially regulated over time and by the numbers of task repetitions (Yin et al., 2009; Bureau et al., 2010; D'Amours et al., 2011; Lemay-Clermont et al., 2011; Shiflett and Balleine, 2011). For instance, levels of phosphorylated ERK 1/2 were selectively induced in parallel with an upregulation of c-Fos in the cerebellum, motor cortex, cingulate cortex and dorsal

striatum during the consolidation phase (Bureau et al., 2010). It is conceivable that a transitory surge of mTOR activity occurs in the cortex and cerebellum, which was returned to normal levels at the time we sacrificed the animal. Our data in the hippocampus are interesting because previous studies have demonstrated that it is not considerably engaged during the rotarod training, despite its recognized role in long-term memory and spatial learning (Bureau et al., 2010). It would be interesting to investigate whether this increase of mTOR levels after the first session of rotarod is due to motor skill learning or to hippocampal dependent behaviors such as spatial learning or object recognition. Further analysis is ultimately needed to conclude on the role of mTOR in the anterior cortex, the cerebellum or the hippocampus. Nonetheless, using rapamycin and siRNA treatments, we demonstrate that mTOR of the dorsal striatum is mandatory to motor skill learning. Previous studies have demonstrated the importance of the striatum structure in rotarod training. For instance, rotarod training is completely abolished in the striatum specific NMDAR1 knockout mice (Dang et al., 2006). Interestingly, in our experiments, rapamycin and siRNA treatments do not completely prevent the improvement of performances during rotarod trainings. As no previous study has directly assessed the role of mTOR in motor behavior, it is difficult to compare our data with the literature. It has been shown that mice with genetic deletion of the mTOR downstream target 4EBP2 display low performances at every session of the accelerating rotarod trainings (Banko et al., 2007). However, impaired motor coordination and balance were suspected in this study, but no other tests of motor abilities were performed to discriminate motor execution from motor learning. Many causes could account for an incomplete effect of mTOR inhibitions. Rapamycin and siRNA treatments seem to provide only a partial inhibitory effect on striatal mTOR activity, as measured by the protein levels of the mTOR targets P70S6K and 4EBP1. Adaptive mechanisms may perhaps compensate and counterbalance the reduction in mTOR activity. This is a very interesting idea that merit to be investigated in future. At some point, we believe it will be possible to establish a heuristic model of the mTOR activation at different sites of the brain and understand how these pathways are elaborate in, or the result of, long-term motor learning.

The present study demonstrates that striatal mTOR activity has no influence in the early phase of learning but interferes with the later phases during the accelerating rotarod training, which are known to be associated with consolidation processes (Luft and Buitrago, 2005). Notably, mTOR inhibitions have been shown to alter memory consolidation and the long-term memory processes of other types of learning task such as non-reinforced retrieval of inhibitory avoidance conditioning (a fear-motivated memory task), in discrimination of complex auditory stimuli as well as in a fear conditioning task (Schicknick et al., 2008; Sui et al., 2008; Jobim et al., 2011a; Jobim et al., 2011b). A role for mTOR in general memory processes is predictable based on the numerous published studies on this topic (Jernigan et al., 2011; Talos et al., 2012; Chandran et al., 2013), but its implication in the encoding processes associated with long-term motor memory is novel. During the learning of a complex motor task, short-term improvements occur over repeated running trials within the first session (intrasession). Long-term improvements (intersession) develop over two to three sessions with rest periods between each session. This later type of memory stabilization involves neuronal processing after the training that transfers the memory from an unsteady state to a more stable state (Yin et al., 2009). Our data demonstrate that phosphorylation levels of mTOR are enhanced at the end of the first session, whereas they are not affected on the following sessions. This indicates that mTOR protein activation is necessary to initiate the molecular sequence leading to memory stabilisation during rotarod training. Further experiments would be necessary to investigate how mTOR activation could influence molecular mechanisms of motor memory from an unsteady state to a more stable state. Our findings do propose, however, that the activity of two downstream molecular targets of mTORC1, P70S6K and 4EBP1, are clearly involved. Such as demonstrated previously in vitro and in vivo (Sarbasov et al., 2005; Wang and Proud, 2006; Hoeffler and Klann, 2009; Urbanska et al., 2012), we observed a reduction in the levels of phosphorylated P70S6K and phosphorylated 4EBP1 following systemic or intrastriatal injections of rapamycin as well as intrastriatal genetic knockdown of mTOR. Therefore, depressing downstream molecular targets of mTORC1 is associated with impaired memory consolidation during the learning of a complex motor skill.

By using pharmacological and siRNA tools, in the dorsal striatum, we have demonstrated that mTOR activation play a significant role in motor learning processes. In particular, we established that mTORC1 activation via the phosphorylation of P70S6K and 4EBP1 is one important molecular pathway implicated in the consolidation of the learning, but not the execution capacity of the accelerating rotarod skill. Understanding the relationship between molecular processes and motor adaptive behaviour is an important but daunting goal in this research field. We believe our study makes one step further toward a better understanding of proteins interaction, organization and function and this will lead to a global view of the role of synapses in the control and learning of motor behaviours.

Conflict of interest statement

This research was conducted without any commercial or financial relationships that could be considered as a potential conflict of interest.

Author contributions

Yan Bergeron conducted this research. Yan Bergeron, Geneviève Bureau and Laure Chagniel executed surgical procedures. Yan Bergeron and Michel Cyr wrote the manuscript. Michel Cyr supervised the project. Michel Cyr and Guy Massicotte contributed to the conceptual frame of the study and edited the manuscript.

Acknowledgements

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Grant 311763) and the Canada Research Chair in Molecular Neuropharmacology. L.C was the holder of doctorate research merit scholarship from the Fonds de Recherche du Québec Nature et Technologies (FQRNT).

References

- Banko, J.L., Merhav, M., Stern, E., Sonenberg, N., Rosenblum, K., and Klann, E. (2007). Behavioral alterations in mice lacking the translation repressor 4E-BP2. *Neurobiol Learn Mem* 87, 248-256. doi: S1074-7427(06)00111-0
- Bekinschtein, P., Katze, C., Slipczuk, L.N., Igaz, L.M., Cammarota, M., Izquierdo, I., and Medina, J.H. (2007). mTOR signaling in the hippocampus is necessary for memory formation. *Neurobiol Learn Mem* 87, 303-307. doi: S1074-7427(06)00103-1
- Belelovsky, K., Kaphzan, H., Elkobi, A., and Rosenblum, K. (2009). Biphasic activation of the mTOR pathway in the gustatory cortex is correlated with and necessary for taste learning. *J Neurosci* 29, 7424-7431. doi: 29/23/7424
- Buitrago, M.M., Schulz, J.B., Dichgans, J., and Luft, A.R. (2004). Short and long-term motor skill learning in an accelerated rotarod training paradigm. *Neurobiol Learn Mem* 81, 211-216. doi: 10.1016/j.nlm.2004.01.001
- Bureau, G., Carrier, M., Lebel, M., and Cyr, M. (2010). Intrastratial inhibition of extracellular signal-regulated kinases impaired the consolidation phase of motor skill learning. *Neurobiol Learn Mem* 94, 107-115. doi: S1074-7427(10)00081-X
- Chandran, A., Iyo, A.H., Jernigan, C.S., Legutko, B., Austin, M.C., and Karolewicz, B. (2013). Reduced phosphorylation of the mTOR signaling pathway components in the amygdala of rats exposed to chronic stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 40, 240-245. doi: S0278-5846(12)00193-5
- Citri, A., and Malenka, R.C. (2008). Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33, 18-41. doi: 1301559
- Costa, R.M., Cohen, D., and Nicolelis, M.A. (2004). Differential corticostriatal plasticity during fast and slow motor skill learning in mice. *Curr Biol* 14, 1124-1134. doi: 10.1016/j.cub.2004.06.053
- D'amours, G., Bureau, G., Boily, M.J., and Cyr, M. (2011). Differential gene expression profiling in the mouse brain during motor skill learning: focus on the striatum structure. *Behav Brain Res* 221, 108-117. doi: S0166-4328(11)00134-3
- Dang, M.T., Yokoi, F., Yin, H.H., Lovinger, D.M., Wang, Y., and Li, Y. (2006). Disrupted motor learning and long-term synaptic plasticity in mice lacking NMDAR1 in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15254-15259. doi: 0601758103

- Deli, A., Schipany, K., Rosner, M., Hoyer, H., Pollak, A., Li, L., Hengstschlager, M., and Lubec, G. (2012). Blocking mTORC1 activity by rapamycin leads to impairment of spatial memory retrieval but not acquisition in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res* 229, 320-324. doi: S0166-4328(12)00036-8
- Doyon, J., and Benali, H. (2005). Reorganization and plasticity in the adult brain during learning of motor skills. *Curr Opin Neurobiol* 15, 161-167. doi: S0959-4388(05)00036-X
- Garelick, M.G., and Kennedy, B.K. (2011). TOR on the brain. *Exp Gerontol* 46, 155-163. doi: S0531-5565(10)00274-3
- Gkogkas, C., Sonenberg, N., and Costa-Mattioli, M. (2010). Translational control mechanisms in long-lasting synaptic plasticity and memory. *J Biol Chem* 285, 31913-31917. doi: R110.154476
- Hoeffler, C.A., and Klann, E. (2009). mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends Neurosci* 33, 67-75. doi: S0166-2236(09)00187-8
- Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Ruegg, M.A., Hall, A., and Hall, M.N. (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* 6, 1122-1128. doi: ncb1183
- Jernigan, C.S., Goswami, D.B., Austin, M.C., Iyo, A.H., Chandran, A., Stockmeier, C.A., and Karolewicz, B. (2011). The mTOR signaling pathway in the prefrontal cortex is compromised in major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35, 1774-1779. doi: S0278-5846(11)00166-7
- Jobim, P.F., Pedroso, T.R., Christoff, R.R., Werenicz, A., Maurmann, N., Reolon, G.K., and Roesler, R. (2011a). Inhibition of mTOR by rapamycin in the amygdala or hippocampus impairs formation and reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Neurobiol Learn Mem* 97, 105-112. doi: S1074-7427(11)00176-6
- Jobim, P.F., Pedroso, T.R., Werenicz, A., Christoff, R.R., Maurmann, N., Reolon, G.K., Schroder, N., and Roesler, R. (2011b). Impairment of object recognition memory by rapamycin inhibition of mTOR in the amygdala or hippocampus around the time of learning or reactivation. *Behav Brain Res* 228, 151-158. doi: S0166-4328(11)00846-1
- Kreitzer, A.C., and Malenka, R.C. (2008). Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron* 60, 543-554. doi: S0896-6273(08)00959-8

- Lamming, D.W., Ye, L., Katajisto, P., Goncalves, M.D., Saitoh, M., Stevens, D.M., Davis, J.G., Salmon, A.B., Richardson, A., Ahima, R.S., Guertin, D.A., Sabatini, D.M., and Baur, J.A. (2012) Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science* 335, 1638-1643. doi: 335/6076/1638
- Lemay-Clermont, J., Robitaille, C., Auberson, Y.P., Bureau, G., and Cyr, M. (2011). Blockade of NMDA receptors 2A subunit in the dorsal striatum impairs the learning of a complex motor skill. *Behav Neurosci* 125, 714-723. doi: 2011-18200-001
- Luft, A.R., and Buitrago, M.M. (2005). Stages of motor skill learning. *Mol Neurobiol* 32, 205-216. doi: MN:32:3:205
- Luft, A.R., Buitrago, M.M., Ringer, T., Dichgans, J., and Schulz, J.B. (2004). Motor skill learning depends on protein synthesis in motor cortex after training. *J Neurosci* 24, 6515-6520. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1034-04.2004
- Lynch, M.A. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84, 87-136. doi: 10.1152/physrev.00014.2003
- Packard, M.G., and Knowlton, B.J. (2002). Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annu Rev Neurosci* 25, 563-593. doi: 10.1146/annurev.neuro.25.112701.142937
- Qi, S., Mizuno, M., Yonezawa, K., Nawa, H., and Takei, N. (2010). Activation of mammalian target of rapamycin signaling in spatial learning. *Neurosci Res* 68, 88-93. doi: S0168-0102(10)00165-3
- Richter, J.D., and Klann, E. (2009). Making synaptic plasticity and memory last: mechanisms of translational regulation. *Genes Dev* 23, 1-11. doi: 23/1/1
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol* 17, 596-603. doi: S0955-0674(05)00148-1
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Sengupta, S., Sheen, J.H., Hsu, P.P., Bagley, A.F., Markhard, A.L., and Sabatini, D.M. (2006). Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 22, 159-168. doi: S1097-2765(06)00218-8
- Schicknick, H., Schott, B.H., Budinger, E., Smalla, K.H., Riedel, A., Seidenbecher, C.I., Scheich, H., Gundelfinger, E.D., and Tischmeyer, W. (2008). Dopaminergic modulation of auditory cortex-dependent memory consolidation through mTOR. *Cereb Cortex* 18, 2646-2658. doi: bhn026

- Shiflett, M.W., and Balleine, B.W. (2011). Molecular substrates of action control in cortico-striatal circuits. *Prog Neurobiol* 95, 1-13. doi: S0301-0082(11)00085-2
- Sui, L., Wang, J., and Li, B.M. (2008). Role of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of the rapamycin signaling pathway in long-term potentiation and trace fear conditioning memory in rat medial prefrontal cortex. *Learn Mem* 15, 762-776. doi: 15/10/762
- Swiech, L., Perycz, M., Malik, A., and Jaworski, J. (2008). Role of mTOR in physiology and pathology of the nervous system. *Biochim Biophys Acta* 1784, 116-132. doi: S1570-9639(07)00195-1
- Talos, D.M., Sun, H., Zhou, X., Fitzgerald, E.C., Jackson, M.C., Klein, P.M., Lan, V.J., Joseph, A., and Jensen, F.E. (2012). The interaction between early life epilepsy and autistic-like behavioral consequences: a role for the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. *PLoS One* 7, e35885. doi: 10.1371/journal.pone.0035885
- Thakker, D.R., Natt, F., Husken, D., Maier, R., Muller, M., Van Der Putten, H., Hoyer, D., and Cryan, J.F. (2004). Neurochemical and behavioral consequences of widespread gene knockdown in the adult mouse brain by using nonviral RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17270-17275. doi: 0406214101
- Urbanska, M., Gozdz, A., Swiech, L.J., and Jaworski, J. (2012). Mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) and 2 (mTORC2) control the dendritic arbor morphology of hippocampal neurons. *J Biol Chem* 287, 30240-30256. doi: M112.374405
- Wang, X., and Proud, C.G. (2006). The mTOR pathway in the control of protein synthesis. *Physiology (Bethesda)* 21, 362-369. doi: 21/5/362
- Yin, H.H., Mulcare, S.P., Hilario, M.R., Clouse, E., Holloway, T., Davis, M.I., Hansson, A.C., Lovinger, D.M., and Costa, R.M. (2009). Dynamic reorganization of striatal circuits during the acquisition and consolidation of a skill. *Nat Neurosci* 12, 333-341. doi: nn.2261

Figures

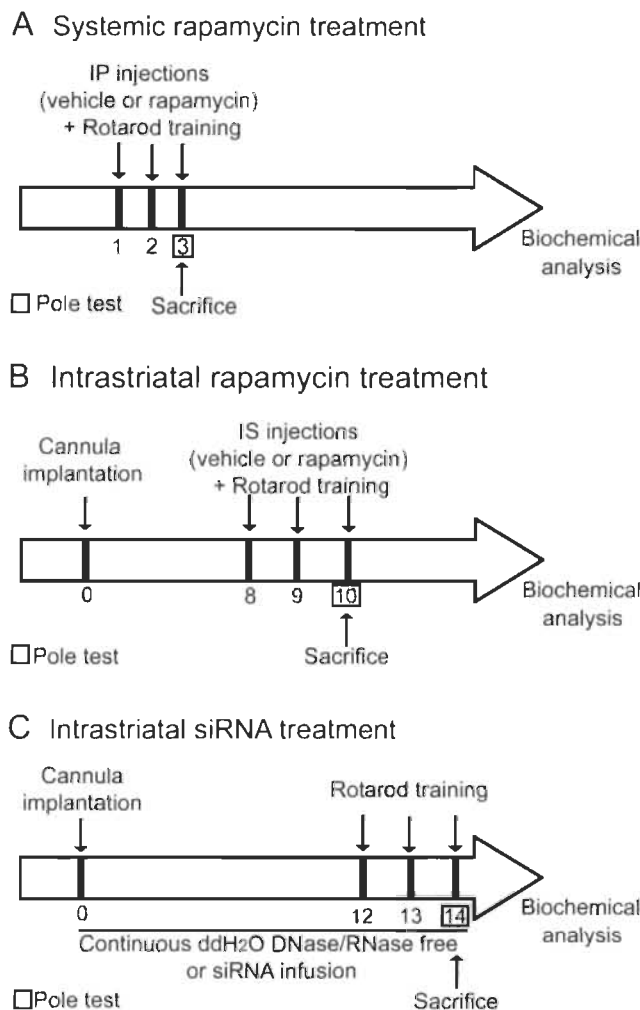


Figure 1 Illustration depicting the experimental design.

All animals were subjected to the same handling treatment before the experiments. **(A)** For systemic treatment, mice were injected systemically with vehicle (DMSO) or rapamycin 15 min prior each rotarod training session. **(B)** For intrastratial treatment, a bilateral guide cannula was implanted in the dorsal striatum of mice. After the surgery, seven days of recovery were given to the mice before starting the experiments. 15 min prior the first trial of each rotarod training days, injection of vehicle (DMSO) or rapamycin was delivered into the dorsal striatum of both hemispheres. **(C)** For intrastratial siRNA infusion, a bilateral connector cannula was installed into the dorsal striatum. Two osmotic mini-pumps were surgically placed subcutaneously on each side of the scapulae and connected to the cannula via a plastic connector. Mice were receiving for 14 consecutive days a continuous intrastratial infusion with either distilled/deionized water DNase/RNase free or mTOR siRNA. Mice were trained on the rotarod on the 12th, 13th, and 14th days of treatment.

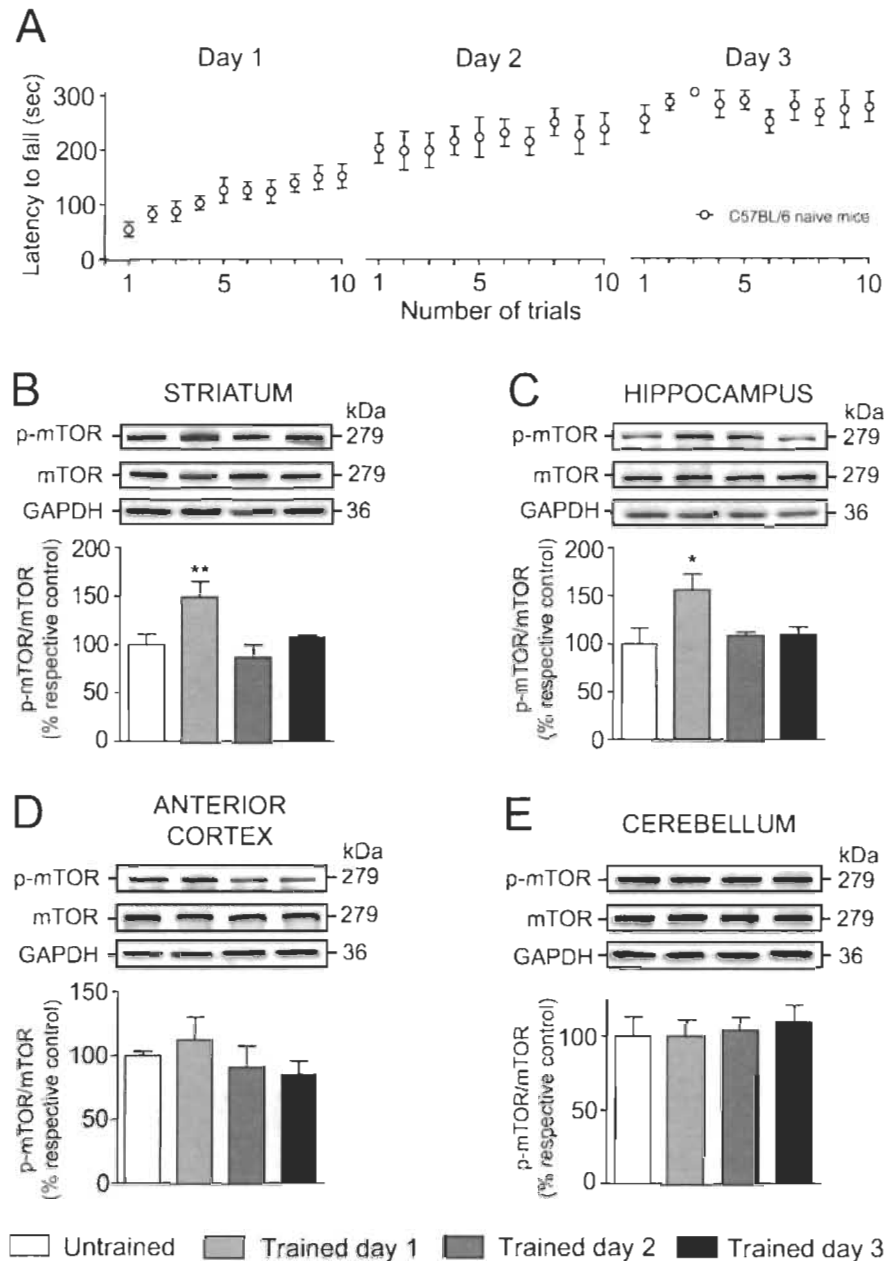


Figure 2 Levels of phosphorylated mTOR is modulated by rotarod training in specific brain regions.

(A) Latency to fall on the accelerating rotarod for each trial at days 1, 2, and 3. Levels of total mTOR and phosphorylated mTOR were evaluated by western blot in the (B) striatum, (C) hippocampus, (D) anterior cortex, and (E) cerebellum of trained mice at days 1, 2, and 3. The data, expressed relative to levels of total mTOR, represent the mean of relative optical density of phosphorylated mTOR (expressed as a percentage of control values) \pm SEM, $n = 3$ or 4; triplicate experiments for each mouse/group. $**P < 0.01$ and $*P < 0.05$ vs. respective untrained group.

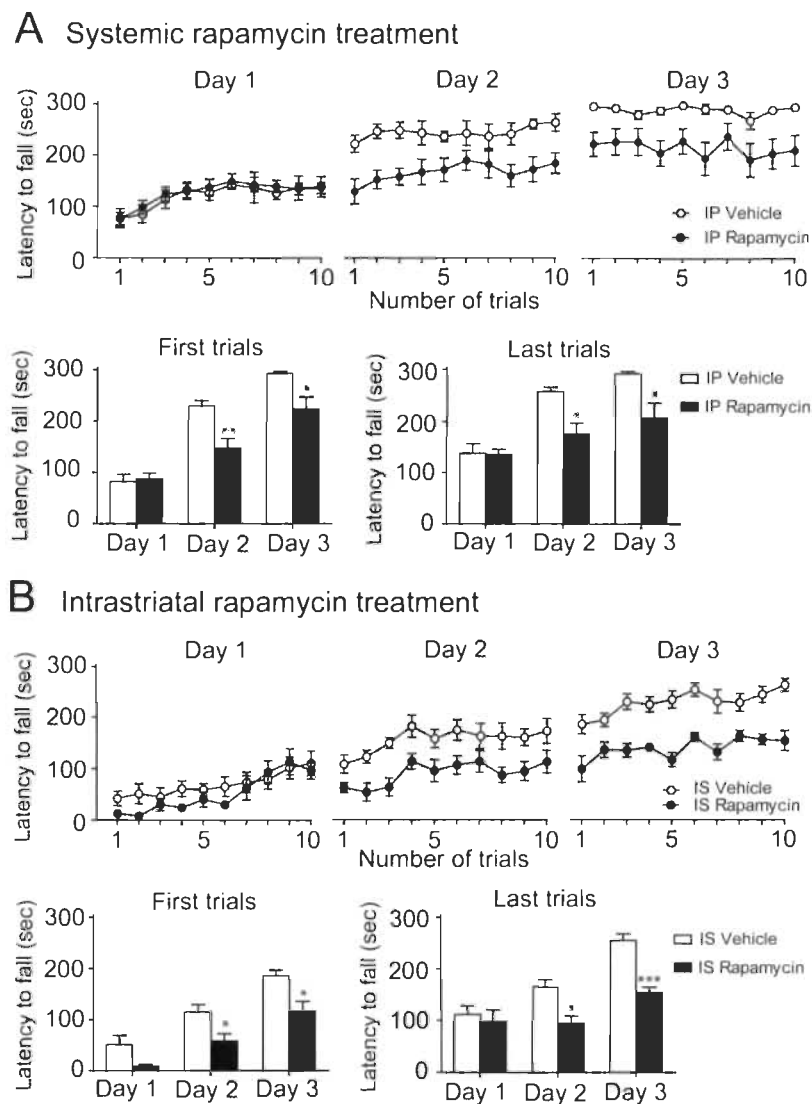


Figure 3 Systemic and intrastratial inhibitions of mTOR by rapamycin impaired motor learning.

(A) Time spent by vehicle (DMSO) and intraperitoneal (IP) rapamycin-treated mice on the accelerating rotarod for each trial at days 1, 2, and 3. Rotarod learning was analyzed by pooling together the two first or the two last trials/training day of both groups. Values represent the average mean latency to fall expressed in seconds \pm SEM, $n = 8$ vehicle-treated mice and $n = 12$ rapamycin-treated mice. $**P < 0.01$ and $*P < 0.05$ vs. respective vehicle-treated group. **(B)** Time spent by vehicle (DMSO) and intrastratial (IS) rapamycin-treated mice on the accelerating rotarod for each trial at days 1, 2, and 3. Rotarod learning was analyzed by pooling together the two first or the two last trials/training day of both groups. Values represent the average mean latency to fall expressed in seconds \pm SEM, $n = 7$ vehicle-treated mice and $n = 4$ rapamycin-treated mice. $***P < 0.001$ and $*P < 0.05$ vs. respective vehicle-treated group.

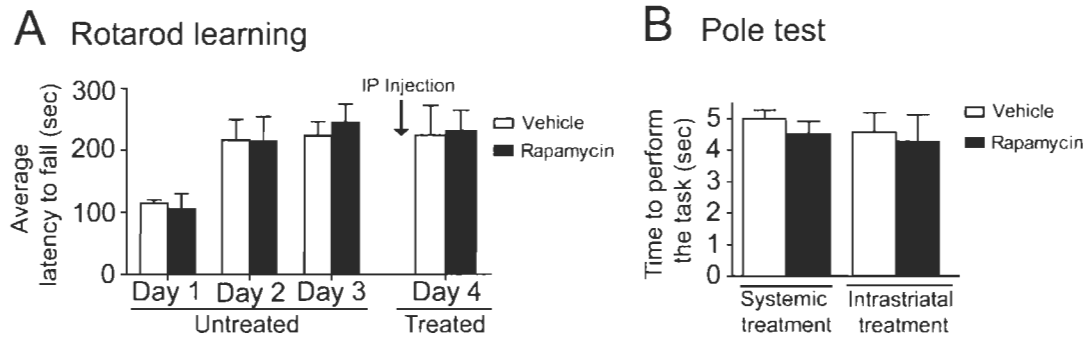


Figure 4 Motor abilities are not affected in mice after mTOR inhibitions. (A) Mice were trained on the accelerating rotarod during 4 days. At day 4, mice were systemically injected with either vehicle (DMSO) or rapamycin. Data represent the average mean latency to fall expressed in seconds from 10 assays per training day \pm SEM, $n = 3-4$ mice/group. (B) Motor abilities in systemic and intrastratial rapamycin-treated mice were assessed by the pole test and compared to the vehicle (DMSO) treated mice. Data represent the time required to perform the task in seconds \pm SEM, $n = 3-12$ mice/groups.

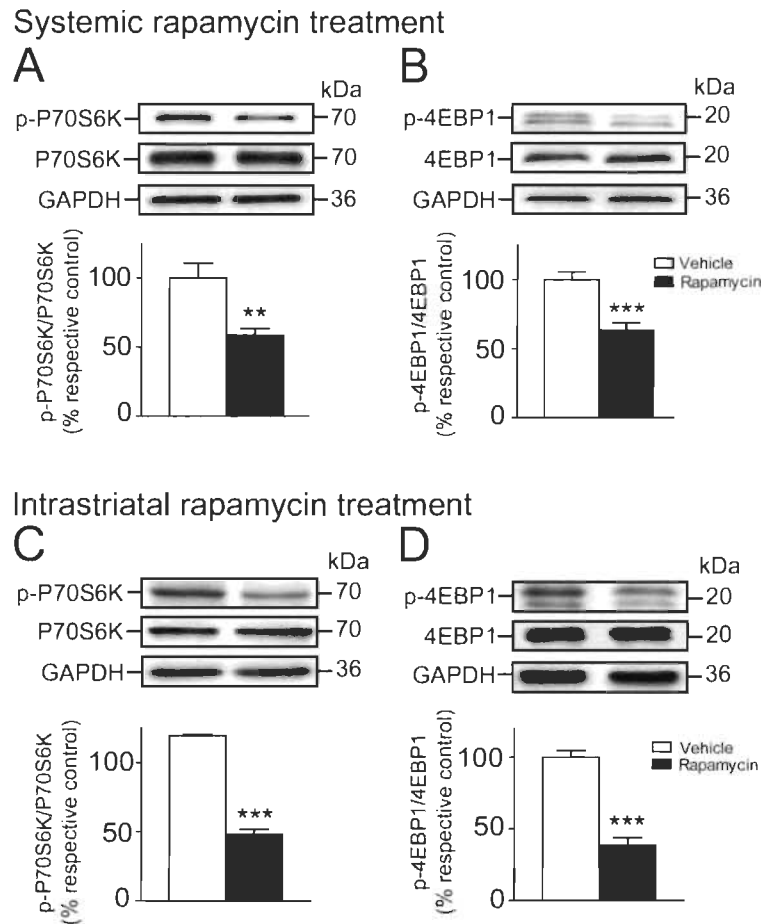


Figure 5 Systemic and intrastriatal rapamycin treatments decreased the phosphorylation levels of striatal mTORC1 downstream substrates. Levels of total and phosphorylated (A) P70S6K and (B) 4EBP1 were evaluated by western blot after systemic rapamycin treatments. The data, expressed to relative total P70S6K or 4EBP1 levels, represent the mean of relative optical density of phosphorylated P70S6K or 4EBP1 (expressed as a percentage of control values) \pm SEM, $n = 8-12$ vehicle (DMSO) and rapamycin-treated mice; triplicate experiments for each mouse/group. *** $P < 0.001$ and ** $P < 0.01$ vs. vehicle-treated group. Levels of total and phosphorylated (C) P70S6K and (D) 4EBP1 were also evaluated following intrastriatal rapamycin treatments. The data, expressed to relative total P70S6K or 4EBP1 levels, represent the mean of relative optical density of phosphorylated P70S6K or 4EBP1 (expressed as a percentage of control values) \pm SEM, $n = 3-4$ vehicle (DMSO) and rapamycin-treated mice; triplicate experiments for each mouse/group. *** $P < 0.001$ vs. vehicle-treated group.

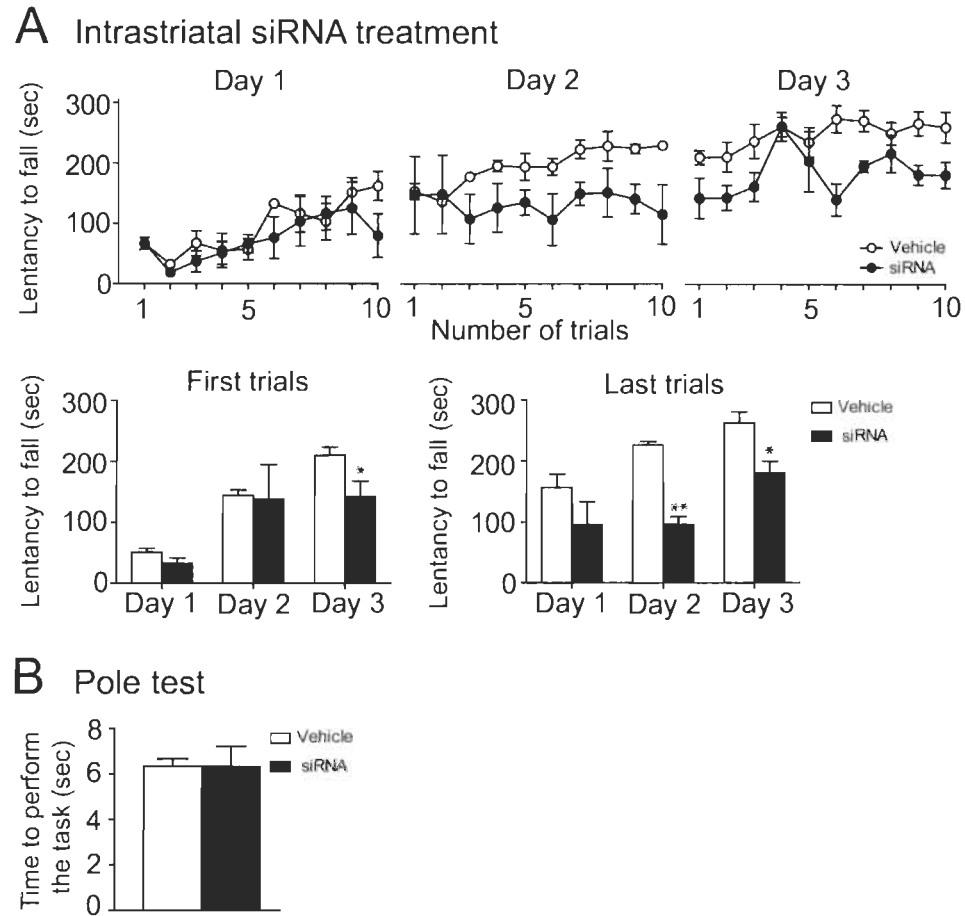


Figure 6 **mTOR siRNA infusion impaired rotarod learning.** (A) Time spent by vehicle (distillated/deionized water DNase/RNase free) and siRNA-treated mice on the accelerating rotarod for each trial at days 1, 2, and 3. Rotarod learning was analyzed by pooling together the two first or the two last trials/training day of both groups. Data represent the average mean latency to fall expressed in seconds \pm SEM, $n = 3-4$ vehicle-treated and siRNA-treated mice. $**P < 0.01$ and $*P < 0.05$ vs. respective vehicle-treated group. (B) Motor abilities of mTOR siRNA-treated mice were also assessed by the pole test and compared to their respective controls. Data represent the time required to perform the task in second \pm SEM, $n = 3-4$ mice/groups.

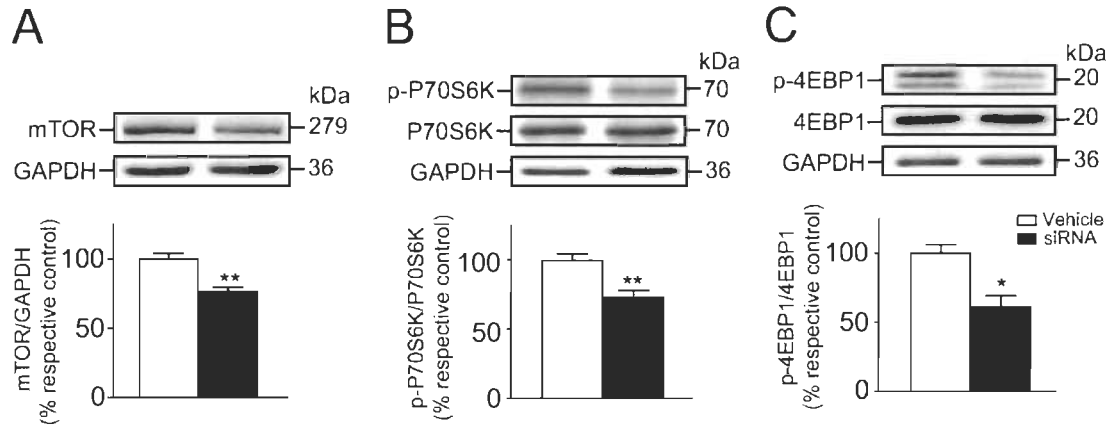


Figure 7 mTOR siRNA infusion inhibited striatal mTOR expression and decreased the levels of phosphorylated P70S6K and 4EBP1.

(A) Levels of total striatal mTOR were evaluated by western blot after the infusion of vehicle (distillated/deionized water DNase/RNase free) or mTOR siRNA. The data, expressed relative to GAPDH, represent the mean of relative optical density of total mTOR (expressed as a percentage of control values) \pm SEM, $n = 3-4$; triplicate experiments for each mouse/group. $**P < 0.01$ vs. vehicle-treated group. Levels of total and phosphorylated (B) P70S6K and (C) 4EBP1 were also evaluated. The data, expressed to relative levels of total P70S6K or 4EBP1, represent the mean of relative optical density of phosphorylated P70S6K or 4EBP1 (expressed as a percentage of control values) \pm SEM, $n = 3-4$ vehicle-treated and siRNA-treated mice; triplicate experiments for each mouse/group. $**P < 0.01$ and $*P < 0.05$ vs. vehicle-treated group.

CHAPITRE VI

DISCUSSION

Afin de mieux comprendre les bases moléculaires de nos comportements, il est essentiel d'étudier les fonctions des protéines et leurs voies de signalisation. Dans cet ordre d'idée, les études présentées dans cette thèse se sont intéressées au lien entre divers comportements de la souris et les protéines Akt3, GSK3 et mTOR. Dans un premier temps, nous avons déterminé l'importance de ces trois protéines lors de l'exécution et la mémorisation d'une nouvelle tâche motrice complexe. Par la suite, nous avons concentré notre étude sur la compréhension du rôle de la protéine Akt3 pour d'autres types de mémoires affectant plutôt la cognition ainsi que les comportements liés aux maladies psychiatriques. L'ensemble de ces travaux a été présenté sous forme de deux articles scientifiques aux chapitres III et IV.

6.1 Implication des protéines Akt3-GSK3-mTOR dans l'apprentissage moteur

Tel que décrit à la section 2.3, l'apprentissage d'une tâche motrice se divise en deux principales phases : une phase initiale rapide, où le gain de performance est grand, suivit d'une phase de consolidation, où l'amélioration des performances se fait plus lentement jusqu'à atteindre une asymptote. En utilisant le rotarod comme outil, ce qui nous permet de reproduire les différentes phases d'un nouvel apprentissage moteur, les résultats de mes travaux, associés à ceux du laboratoire (Ouimet, Pepin et al. 2019), démontrent que les protéines Akt3 et mTOR participent à la mémorisation motrice, et ce, de manière différentielle en fonction des phases d'apprentissage. D'une part, de récents travaux au laboratoire montrent que les souris Akt3 KO ont un retard d'apprentissage marqué dès la première journée d'entraînement au rotarod. Toutefois, les souris améliorent leurs performances au fil de la deuxième et troisième journée, jusqu'à atteindre des performances comparables aux souris de phénotype sauvage dans leurs derniers essais.

Ainsi, ces résultats suggèrent que la protéine Akt3 participe aux processus moléculaires de l'apprentissage moteur lors de la phase rapide d'entraînement. D'autre part, mes travaux démontrent que l'apprentissage d'une nouvelle tâche motrice complexe est altéré par l'inhibition pharmacologique et la délétion génétique de mTOR. Spécifiquement, l'injection systémique et intrastriatale de rapamycine ainsi que l'injection au striatum d'un siRNA ciblant mTOR n'ont aucune influence sur les performances motrices au rotarod lors de la première journée (phase rapide), mais altèrent plutôt les performances motrices à la deuxième et troisième journée (phase lente). Il est à noter que contrairement au souris Akt3 KO, les souris dont l'activité de mTOR est réduite finissent par atteindre un plateau de performances nettement plus bas que les souris de phénotype sauvage à la fin des trois journées d'entraînement. Ainsi, ces résultats proposent que la protéine mTOR participe aux processus moléculaires de l'apprentissage moteur lors de la phase lente d'apprentissage.

En comparant nos résultats avec ceux de la littérature, il est possible de faire ressortir différentes hypothèses pour expliquer l'implication des protéines Akt3, GSK3 et mTOR dans l'apprentissage moteur. D'une part, nos résultats montrent que la délétion d'Akt3 résulte en la diminution d'environ 50 % de la phosphorylation de GSK3 α/β sur les sérines 21/9 dans diverses structures impliquées à l'apprentissage moteur. Une autre étude du laboratoire récemment publiée montre une augmentation de 40 % de la phosphorylation de GSK3 α/β sur les tyrosines 279/216 chez les souris Akt3 (Ouimet, Pepin et al. 2019). La diminution de la phosphorylation sur les sites sérines ainsi que l'augmentation de la phosphorylation sur les sites tyrosines sont associées à l'hyperactivité de GSK3 α/β (Sutherland 2011, Beurel, Grieco et al. 2015). Il est connu que la régulation adéquate de l'activité de GSK3 est essentielle aux mécanismes de plasticité synaptique (Peineau, Taghibiglou et al. 2007, Salcedo-Tello, Ortiz-Matamoros et al. 2011). Ainsi, il est possible que l'hyperactivité de GSK3 perturbe la plasticité synaptique, un processus important lors de la phase rapide d'un apprentissage moteur (Dayan, 2011). D'autre part, le principal effet de l'inhibition de la protéine mTOR sur l'apprentissage moteur s'observe lors de la phase lente d'apprentissage. Il est connu que cette phase est associée au processus de consolidation de la tâche motrice complexe (Luft, 2005). De manière intéressante, il a déjà

été démontré que l'inhibition de mTOR altère la phase de consolidation dans différents paradigmes expérimentaux. À titre d'exemples, deux études indépendantes montrent que l'injection systémique ou directement au niveau de l'amygdale altère la consolidation de mémoires associées à la peur (Glover, Ressler et al. 2010, Jobim, Pedrosa et al. 2012). Deux autres études démontrent que l'injection de rapamycine au niveau du cortex auditif et gustatif altère la consolidation de divers apprentissages associés à ces structures (Tischmeyer, Schicknick et al. 2003, Belevsky, Kaphzan et al. 2009). Malgré ces évidences, l'implication de la protéine mTOR dans les processus d'encodage associés à la consolidation d'un nouvel apprentissage moteur n'a jamais été relevée auparavant. Lors de l'apprentissage d'une tâche motrice complexe, l'amélioration à long terme des performances (la consolidation) est possible grâce à l'activation de processus neuronaux à la fin des séances d'entraînement. Ces processus neuronaux permettent de stabiliser la mémoire du nouvel apprentissage moteur d'un état volatile à un état plus stable (Dayan, 2011; Yin, 2009). Dans cet ordre d'idée, nos résultats montrent qu'il y a une augmentation de 50 % de la phosphorylation de mTOR au striatum uniquement à la première journée d'apprentissage au rotarod. Cependant, l'effet de l'inhibition de mTOR sur les performances motrices ne s'observe qu'à la deuxième et troisième journée d'entraînement au rotarod. Alors, il est possible que l'activation de mTOR au striatum à la première journée d'entraînement soit nécessaire à l'initiation de différents processus moléculaires permettant la stabilisation à long terme du nouvel apprentissage moteur lors de la deuxième et troisième journée. Pour appuyer cette hypothèse, nos résultats montrent que l'inhibition de mTOR n'a aucun effet sur les différentes phases d'apprentissage au rotarod lorsque la tâche motrice complexe a été préalablement apprise.

Mise à part notre étude, l'implication précise de la protéine mTOR aux processus moléculaires permettant la stabilisation à long terme d'un nouvel apprentissage moteur n'était pas connue. À la suite de l'injection systémique de rapamycine, une diminution d'environ 40 % de la phosphorylation de S6K1/2 et de 4EBP1 a été observée. Dans le même ordre d'idée, une réduction de 50 à 60 % de la phosphorylation de ces substrats a été relevée suivit l'injection intrastriatale de rapamycine. Enfin, l'utilisation du siRNA directement au striatum a occasionné une baisse de 25 % de la quantité de mTOR,

ce qui a induit une perte de 30 % et 40 % de la phosphorylation de S6K1/2 et de 4EBP1 respectivement. La diminution de phosphorylation de S6K1/2 et de 4EBP1, jumelée aux troubles d'apprentissage au rotarod pendant la phase lente, suggèrent que ces deux cibles moléculaires de mTORC1 sont aussi associées au processus de consolidation de l'apprentissage d'une tâche motrice complexe. L'un des processus moléculaires important à la formation d'un nouvel apprentissage moteur est la synthèse de protéine (Galvao-Ferreira, Lipinski et al. 2017). De manière intéressante, il est connu que l'activité de mTOR ainsi que celle de ses substrats S6K1/2 et de 4EBP1 est importante à la formation de différentes formes de mémoire par l'entremise de la synthèse de nouvelles protéines (Davis and Squire 1984, Luft, Buitrago et al. 2004, Wang and Proud 2006, Ma and Blenis 2009, Graber, McCamphill et al. 2013). Dans la littérature, il a déjà été relevé que la synthèse des protéines CamKII et *activity-regulated cytoskeleton-associated protein* (ARC) puisse être modulée par la signalisation de mTORC1 (Hou and Klann 2004, Mameli, Balland et al. 2007, Menard and Quirion 2012). La protéine CamKII est critique aux mécanismes de plasticité synaptique; une fois active, CamKII phosphoryle différentes sous-unités des récepteurs AMPA ou déplace les récepteurs AMPA nouvellement intégrés à la membrane jusqu'à la dendrite postsynaptique. L'ensemble de ces actions résulte en une augmentation de la conductance et de l'excitabilité neuronale (Shonesy, Jalan-Sakrikar et al. 2014, Zalzman, Federman et al. 2018). Une étude de notre laboratoire montre que l'expression de CamKII est augmentée au striatum après l'entraînement au rotarod (D'Amours, Bureau et al. 2011). Jumelé à notre étude, d'autres groupes de recherche démontrent que CamKII au striatum est essentielle aux processus de plasticité synaptique ainsi qu'à l'apprentissage d'une nouvelle tâche motrice (Klug, Mathur et al. 2012, Wang, Yin et al. 2017). Dans le même ordre d'idée, de nombreuses études ont souligné l'implication de la protéine Arc aux processus de plasticité synaptique. En particulier, cette protéine modulerait l'excitabilité neuronale en interagissant sur les récepteurs AMPA et NMDA (Zhang, Wu et al. 2015, Manago, Mereu et al. 2016). D'un point de vue comportemental, la régulation de la protéine Arc est critique à la formation et la consolidation de diverses formes de mémoire, dont la mémoire motrice (Kedrov, Durymanov et al. 2019). En somme, il est possible que l'inhibition de la signalisation de mTORC1 au niveau du striatum ait diminuée la synthèse des protéines

ARC et CamKII; cela pourrait expliquer les performances motrices obtenues au rotarod. Finalement, la synaptogenèse est un autre processus critique à la mémorisation motrice (Viggiano, Speranza et al. 2018) et la signalisation mTORC1 a déjà été associée à ce processus dans d'autres contextes liés à la mémoire (Hoeffler and Klann 2010, Graber, McCamphill et al. 2013). Il est possible que la dérégulation de la synaptogenèse, induite par l'inhibition de l'activité de mTORC1, soit aussi responsable des troubles d'apprentissage observés au rotarod.

Dans les dernières années, de plus en plus d'études illustrent l'importance de mTORC2 dans certaines fonctions cérébrales. En effet, en plus de jouer un rôle dans la croissance normale du cerveau (Thomanetz, Angliker et al. 2013), il a été récemment mis en évidence par Huang et ses collaborateurs que la signalisation de mTORC2 à l'hippocampe est essentielle afin de moduler la polymérisation de l'actine, processus critique à la consolidation de la mémoire à long terme (Huang, Zhu et al. 2013). De plus, une étude récente montre que la signalisation de mTORC2 peut moduler la neurotransmission dopaminergique au striatum (Dadalko, Siuta et al. 2015). Nous croyons que dans le contexte de notre étude, l'utilisation de la rapamycine ne permet pas de discriminer la fonction précise de mTORC2 dans l'apprentissage et la mémorisation motrice. Pendant longtemps, il a été fortement considéré que la rapamycine était un inhibiteur spécifique à mTORC1. Au début des années 90, des études sur le mécanisme d'action de la rapamycine démontrent que ce macrolide interagit avec la protéine FKBP12 pour former un complexe. Ce complexe rapamycine-FKBP12 se lie au domaine FRB de la protéine mTOR, permettant ainsi l'inhibition de l'activité de mTORC1 (Brown, Albers et al. 1994, Sabatini, Erdjument-Bromage et al. 1994). Subséquemment, des résultats issus d'autres études supportent l'idée que le complexe FRBP12-rapamycine inhibe l'activité de mTORC1 par l'entremise d'une altération de l'intégrité structurale. Cela préviendrait l'accès à certains substrats clés, dont S6K1/2 et 4EBP1 (Kim, Sarbassov et al. 2002, Yip, Murata et al. 2010, Kennedy and Lamming 2016, Sabatini 2017). En 2006, Sarbassov et ses collaborateurs ont apporté un éclairage nouveau quant à l'effet de la rapamycine sur les différents complexes de mTOR. Dans leur étude, ils démontrent sur différentes lignées cellulaires que le traitement aigu à la rapamycine altère l'activité de mTORC1, sans avoir

d'effet sur mTORC2, tel que déjà connu. Cependant, il illustre que l'activité de mTORC2 est diminuée dans diverses lignées cellulaires lorsque le traitement à la rapamycine est prolongé. Les auteurs valident aussi cet effet chez la souris en montrant que l'administration intrapéritonéale quotidienne de rapamycine pendant une semaine inhibe l'activité de mTORC2 au niveau du thymus, des poumons, du cœur et des tissus adipeux. (Sarbasov, Ali et al. 2006). Une autre étude, publiée en 2012, vient appuyer l'hypothèse que l'administration chronique de rapamycine puisse inhiber l'activité de mTORC2. Lamming et ses collaborateurs démontrent, dans un contexte lié au métabolisme du glucose chez la souris, que l'administration quotidienne de rapamycine pendant 14 à 28 jours inhibe l'activité de mTORC2 au niveau des cellules musculaires, du tissu adipeux et des cellules hépatiques (Lamming, Ye et al. 2012). Il semblerait que le mécanisme sous-jacent à l'inhibition de mTORC2 par le traitement chronique à la rapamycine implique la dissociation de Rictor du complexe ou implique une protéine qui n'est pas encore identifiée (Sarbasov, Ali et al. 2006, Mukhopadhyay, Frias et al. 2016, Saxton and Sabatini 2017). Malgré les résultats intrigants issus de ces deux publications, l'énigme entourant l'effet de la rapamycine sur mTORC2 reste entière. D'une part, il apparaît que l'inhibition de mTORC2 par la rapamycine est possible seulement à dose prolongée et dans différents types cellulaires spécifiques. De plus, il a été relevé que ce traitement chronique à la rapamycine n'ait eu aucun effet sur l'activité de mTORC2 au cerveau (Schreiber, Ortiz et al. 2015, Mukhopadhyay, Frias et al. 2016). Bref, afin de valider le potentiel rôle de mTORC2 dans l'apprentissage et la mémorisation motrice, des expériences subséquentes utilisant des modèles de souris génétiquement modifiées seraient nécessaires.

6.2 Les protéines Akt3-GSK3-mTOR dans les habiletés motrices

Nos résultats montrent que les souris Akt3 KO ont des performances semblables aux souris de phénotype sauvage au rotarod à vitesse constante, au *pole test*, au *wire test* et au *stepping test*. Aussi, nos résultats montrent que l'inhibition pharmacologique ainsi que la délétion génétique de mTOR n'ont aucun effet sur les performances motrices des souris au *pole test*. Par ailleurs, nous démontrons que l'injection systémique de

rapamycine n'a aucun effet sur les performances motrices au rotarod lorsque cette tâche est préalablement apprise, tel qu'il avait été précédemment illustré (Deli, Schipany et al. 2012). En accord avec nos résultats, différentes études montrent que la signalisation de ces protéines n'aurait pas d'influence sur les capacités motrices. À titre d'exemple, il est montré que la délétion d'Akt1, la délétion d'Akt2, l'inhibition pharmacologique de PI3K, la perte de fonction de TSC1/2 ainsi que le traitement à long-terme de rapamycine n'a aucun impact négatif sur les habiletés motrices des souris (Lai, Xu et al. 2006, Sui, Wang et al. 2008, Sato, Kasai et al. 2012, Leibrock, Ackermann et al. 2013, Fischer, Gelfond et al. 2015, Xue, Yang et al. 2016). Aussi, il est à noter que différents inhibiteurs de mTOR sont évalués en phase clinique pour diverses situations cliniques et les troubles moteurs ne sont jamais mentionnés parmi les effets secondaires observés (Crino 2016). À l'inverse des résultats issus des études précédemment mentionnées, d'autres investigations illustrent que de l'activité de ces protéines est responsable de la manifestation de comportements moteurs anormaux dans certains modèles de souris. Une étude démontre que le traitement à la L-DOPA chez des souris modèles de la maladie de Parkinson augmente l'activité de la signalisation de mTORC1, telle que mesurée par la phosphorylation des cibles P70S6K et 4EBP. Cette suractivité de mTORC1 corrèle avec l'émergence de dyskinésies. L'inhibition de l'activité de mTORC1 avec de la rapamycine ou la délétion génétique de *ras homolog enriched in striatum* (Rhes), une protéine régulatrice en amont de mTORC1, réduit de manière substantielle l'émergence de ces anomalies motrices (Santini, Heiman et al. 2009, Brugnoli, Napolitano et al. 2016). Dans le même ordre d'idée, la suractivité striatale de mTORC1 chez une souris modèle de la maladie d'Huntington accélère l'émergence des troubles de coordinations observés dans cette maladie (Pryor, Biagioli et al. 2014). Enfin, tel que décrit par les auteurs de cette revue de littérature (Bockaert and Marin 2015), il n'y a pas de consensus quant à l'implication exacte de l'activité des protéines Akt et mTOR dans la régulation des habiletés motrices. Bien que des études supplémentaires soient nécessaires afin de clarifier les fonctions de ces protéines à la régulation de comportements moteurs, les résultats issus des études présentées dans cette thèse démontrent que la délétion d'Akt3 ainsi que l'inhibition de la signalisation striatale de mTORC1 chez la souris n'ont pas d'effet sur les habiletés motrices.

6.3 La modulation différentielle de la phosphorylation de mTOR lors d'un nouvel apprentissage moteur

Les résultats présentés montrent une modulation différentielle de la phosphorylation de la protéine mTOR dans diverses structures cérébrales en fonction des phases de l'apprentissage moteur. En effet, la phosphorylation de mTOR à la sérine 2448 est accentuée d'environ 50 %, autant au niveau du striatum et qu'à l'hippocampe pendant la phase rapide (jour 1). Cette phosphorylation retourne au niveau basal pendant la phase lente (2e et 3e journée d'apprentissage). Aucune modulation de la phosphorylation de mTOR n'a été observée au niveau du cortex et du cervelet. Ces résultats, au niveau du cortex et du cervelet, sont intrigants puisque ces structures sont connues pour être impliquées dans l'apprentissage d'une nouvelle tâche motrice. En effet, le cortex est reconnu pour être important à la régulation de la posture du corps, la planification ainsi que l'initiation du mouvement tandis que le cervelet joue un rôle dans la précision et la coordination d'une performance motrice (Purves and Williams 2004). Diverses hypothèses peuvent expliquer ces résultats : d'un point de vue expérimental, il est probable que l'activité de la protéine mTOR au niveau du cortex et du cervelet soit augmentée pendant l'entraînement au rotarod, mais que l'activité soit retournée au niveau basal au moment des sacrifices des souris. D'un autre côté, il est possible que l'activité de la protéine mTOR ne soit pas modulée et nécessaire, au niveau du cortex et du cervelet, lors de l'apprentissage d'une nouvelle tâche motrice. Des travaux réalisés au laboratoire, joints à d'autres (Costa, Cohen et al. 2004, Lehericy, Benali et al. 2005, Qian, Forssberg et al. 2015), ont déjà illustré que diverses voies de signalisation sont différemment régulées en fonction des structures cérébrales et des phases d'apprentissage moteur. À titre d'exemple, une étude réalisée par Chagniel et ses collaborateurs montre que la phosphorylation de la protéine STEP₆₁ est diminuée à l'hippocampe pendant la phase rapide tandis que la phosphorylation de STEP₆₁ est augmentée au cortex et au striatum pendant la phase lente (Chagniel, Bergeron et al. 2014). Des expériences supplémentaires, dans lesquelles l'activité de la protéine mTORC1 est inhibée dans le cortex et le cervelet respectivement nous permettrait de mieux comprendre le rôle de la signalisation de cette protéine au sein de ces structures lors de l'apprentissage d'une nouvelle tâche motrice.

Même si l'hippocampe est principalement reconnu pour être impliqué dans des processus liés à la cognition (Sweatt 2004), il n'en demeure pas moins que cette structure joue aussi un rôle dans l'acquisition d'une nouvelle tâche motrice. En effet, différentes études réalisées chez l'humain montrent qu'il y a activation de l'hippocampe lors de l'acquisition de diverses tâches motrices, dont l'apprentissage de séquences motrices, de séquences oculomotrices et le *digital finger tapping tasks* (Albouy, Sterpenich et al. 2008, Gheysen, Van Opstal et al. 2010, Albouy, Sterpenich et al. 2012). Pendant l'acquisition d'une nouvelle tâche motrice, il est proposé que l'hippocampe ait deux rôles distinctifs. D'une part, puisque l'hippocampe a la capacité d'associer des séquences et d'interpréter des informations spatiales, il est suggéré que cette structure participe à la conception d'une représentation spatiale des séquences motrices (Albouy, King et al. 2013). D'autre part, il est montré que la participation de l'hippocampe pendant l'acquisition d'une tâche motrice est nécessaire au gain de performance observé à la suite d'une nuit de sommeil. Il semblerait que lors de l'acquisition d'une tâche motrice, l'activation de l'hippocampe permet d'engager des regroupements de neurones et ceux-ci seraient réactivés pendant le processus de consolidation nocturne (Albouy, Fogel et al. 2013, Albouy, King et al. 2013). En accord avec la littérature sur le recrutement de l'hippocampe pendant l'acquisition d'une tâche motrice, nos résultats ainsi que ceux du laboratoire mettent en évidence l'activation de mTOR, STEP₆₁ et ERK1/2 au niveau de cette structure à la fin de la première journée d'entraînement. Dans tous les cas, l'activation observée retourne au niveau basal dans les journées subséquentes d'entraînement. L'ensemble de ces résultats suggère qu'il y aurait un processus moléculaire précis à l'hippocampe lors de la première journée d'entraînement au rotarod. Le rôle de la protéine mTOR au sein de ce processus pourrait se définir en deux parties : d'une part, puisque la protéine mTOR a déjà été associée à l'apprentissage et la mémorisation spatiale (Deli, Schipany et al. 2012, Huang, Zhu et al. 2013), il serait possible que l'activation de mTOR au niveau de l'hippocampe lors de la première journée d'entraînement serve à la conception de la représentation spatiale des séquences motrices du rotarod. Une autre possibilité est que l'activation de mTOR au niveau de l'hippocampe soit impliquée dans le mécanisme de consolidation nocturne de la nouvelle tâche motrice. Étant donné son rôle important à la synthèse des protéines, la kinase mTOR a déjà été

associée au processus de consolidation nocturne de divers apprentissages (Seibt, Dumoulin et al. 2012, Gronli, Soule et al. 2013, Tudor, Davis et al. 2016). De plus amples expériences sont nécessaires afin de valider la fonction de l'activation de mTOR au niveau de l'hippocampe pendant l'apprentissage moteur au rotarod.

Lors de la première journée d'apprentissage, il n'a pas été défini quel neurotransmetteur est responsable de l'augmentation de la phosphorylation de mTOR ni dans quel type neuronal ceci se produit. Au début des années 2000, Hou et Klann ont démontré que le traitement de tranches d'hippocampe avec du (*S*)-3,5-Dihydroxyphenylglycine (DHPG), un agoniste des récepteurs métabotropiques du groupe I, augmente la phosphorylation des protéines Akt et mTOR (Hou and Klann 2004). Parallèlement, une autre étude *in vivo* montre que l'administration d'un agoniste des récepteurs mGluR1 engendre l'activation de mTOR, de ses substrats P70S6K et 4EBP au niveau du striatum et de l'hippocampe de rat (Page, Khidir et al. 2006). Il s'avère donc possible que l'activation de mTOR à l'hippocampe et au striatum soit occasionnée par une stimulation glutamatergique. La dopamine est un neurotransmetteur central à l'apprentissage moteur et des études montrent que l'activation de mTOR peut être régulée par une stimulation dopaminergique. La majorité des études sous-tendent que la signalisation de mTOR serait modulée préférentiellement par la voie dopaminergique associée au récepteur de type D1 au striatum. Une étude réalisée par Beckley et ses collaborateurs démontre que la prise d'alcool chez la souris, connu pour accentuer la concentration de dopamine synaptique, module l'activité de mTORC1 préférentiellement dans les neurones épineux exprimant le récepteur dopaminergique D1 (Beckley, Laguesse et al. 2016). Conjointement, ils démontrent que l'injection de l'agoniste des récepteurs dopaminergiques D1 SKF-81927 module l'activité de mTORC1 tandis que l'agoniste des récepteurs dopaminergiques D2 quinpirole n'a aucun effet sur l'activité de mTORC1 (Beckley, Laguesse et al. 2016). En accord avec cette étude, il est démontré par Sutton et Caron que l'augmentation de la phosphorylation de mTOR induite par la délétion de DAT est bloquée par l'administration de l'antagoniste dopaminergique D1 SCH23390, tandis que l'administration de l'antagoniste dopaminergique D2 raclopride n'a aucun effet (Sutton and Caron 2015). Ces résultats sont aussi soutenus par d'autres expériences qui

démontrent que la délétion du récepteur dopaminergique D1 diminue la phosphorylation de mTOR (Sutton and Caron 2015). Il est intéressant de noter que la modulation de la phosphorylation de mTOR par le récepteur dopaminergique D1 ne semble pas exclusive au striatum. En effet, la stimulation répétée de SKF-81927 active la signalisation de mTORC1 au niveau de l'hippocampe (Gangarossa, Ceolin et al. 2014). De plus, les auteurs de cette étude démontrent que l'activation de la signalisation de mTORC1 observée par l'injection répétée de SKF-81927 est fortement atténuée par l'injection concomitante de SCH23390. Une étude mesurant l'activité des neurones du striatum dorsal par électrophysiologie lors de l'apprentissage d'une nouvelle tâche motrice au rotarod a montré l'implication de la voie striatonigrale lo (Yin, Mulcare et al. 2009). Une seconde étude illustre, par le biais de modèles génétiques et pharmacologiques, que la voie striatonigrale dans la région dorsolatérale est essentielle à la mémorisation d'une nouvelle tâche motrice (Durieux, Schiffmann et al. 2012). Ainsi, il est possible que l'activation de mTOR, observée lors de la phase rapide d'apprentissage, se produise spécifiquement dans les neurones de la voie striatonigrale de la région dorsolatérale du striatum. Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant par le biais de futures expériences utilisant la microscopie par immunofluorescence d'évaluer si la phosphorylation de mTOR se réalise, au niveau du striatum dorsomédial et dorsolatéral, préférentiellement dans les neurones de la voie striatonigrale ou de la voie striatopallidale.

6.4 Les protéines Akt3-GSK3 et la modulation de comportements liés aux maladies psychiatriques

Nos résultats montrent que la délétion d'Akt3 induit un déficit du filtrage sensorimoteur et une diminution des capacités sociales, deux phénotypes couramment retrouvés chez les humains et les animaux modèles de la schizophrénie (Nestler and Hyman 2010). D'autre part, nos résultats issus de tests permettant d'évaluer l'efficacité des antidépresseurs (*force swim test*, *tail suspension test*) et issus de tests anxiogènes (*open field*, *elevated-plus maze*, *Light-Dark test*) révèlent que la délétion d'Akt3 induit des troubles comportementaux associés à la dépression et l'anxiété. Initialement, l'intérêt pour Akt aux troubles psychiatriques avait été mis de l'avant par la publication de (Emamian,

Hall et al. 2004), où une diminution du niveau total d'Akt1 dans les lymphocytes et au cerveau de patients atteints de schizophrénie avait été détectée. Les auteurs de cette étude proposaient qu'un défaut au niveau du gène codant la protéine Akt1 entraînerait une prédisposition au développement de la schizophrénie. À la suite de cette publication, de plus en plus d'études ont suggéré que la dérégulation de l'activité d'Akt était associée au développement, aux symptômes (manifestations comportementales) et aux traitements de différentes maladies psychiatriques comme la schizophrénie et les troubles bipolaires (Beaulieu, 2009; Li, 2010). De manière intéressante, deux études pangénomiques récentes ne montrent aucune association entre le gène Akt1 et la schizophrénie, mais elles illustrent plutôt une association significative entre la schizophrénie et des variations génétiques dans le locus de l'isoforme Akt3 exclusivement (Ripke, O'Dushlaine et al. 2013, Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics 2014). À la lumière de ces études, un autre groupe de recherche a découvert que le gène Akt3 pouvait être une cible potentielle contribuant à l'efficacité des traitements utilisés pour traiter la schizophrénie (Ruderfer, Charney et al. 2016). Ainsi, les résultats de nos travaux s'ajoutent aux évidences de la littérature sur l'implication d'Akt et proposent que l'isoforme Akt3 puisse jouer un rôle fondamental dans la pathogenèse et le traitement des maladies psychiatriques.

La protéine Akt est centrale à l'intégration des différents signaux extracellulaires et la modulation de l'activité d'Akt par ces signaux peut avoir un impact sur la régulation de plus d'une centaine de substrats différents. Ainsi, il est possible que l'endophénotype observé provienne d'un dérèglement de la signalisation d'Akt3. Nos résultats montrent que la délétion d'Akt3 induit une diminution d'environ 50 % de la phosphorylation de GSK3 α/β aux sérines 21/9 au niveau du cortex préfrontal, du striatum, de l'hippocampe ainsi que du cervelet. L'activité de cette kinase est reconnue pour jouer un rôle dans les maladies psychiatriques et il a déjà été démontré qu'une réduction de l'activité de cette protéine est associée à des comportements similaires à ceux retrouvés dans la dépression et l'anxiété (Polter, Beurel et al. 2010, Beurel, Grieco et al. 2015). L'utilisation d'un traitement chronique au lithium, un modulateur de l'humeur reconnu pour accentuer la phosphorylation de GSK3 α/β sur les sérines inhibitrices (Mines, Yuskaitis et al. 2010, Monaco, Ferguson et al. 2018), fait en sorte que les souris Akt3 KO ne manifestent plus

les comportements anormaux liés à la dépression et l'anxiété. Conjointement, le traitement chronique au lithium chez les souris Akt3 KO rétablit le niveau de phosphorylation de GSK3 α/β aux sérines 21/9 à un niveau comparable aux souris de phénotype sauvage. Ainsi, nos résultats mettent en lumière l'implication précise de la signalisation Akt3-GSK3 dans les comportements liés à la dépression et l'anxiété chez les souris Akt3 KO. Il est à noter que plusieurs auteurs révèlent qu'une modulation anormale de l'activité distinctive des isoformes de GSK3 dans différentes régions du cerveau peut influencer les comportements sociaux des souris ainsi que la réponse comportementale dans le test du réflexe acoustique de sursaut (Kaidanovich-Beilin, Lipina et al. 2009, Kapfhamer, Berger et al. 2010, Kaidanovich-Beilin and Woodgett 2011, Latapy, Rioux et al. 2012). De plus, d'autres études illustrent que l'inhibition de GSK3 par le lithium ou d'autres composés pharmacologiques permettent de normaliser, chez la souris, certaines anomalies comportementales comme l'associabilité et le déficit du filtrage sensorimoteur (Mines, Yuskaitis et al. 2010, Lipina, Kaidanovich-Beilin et al. 2011). Ainsi, il serait intéressant d'évaluer, par le biais de futures expériences, si la diminution de la phosphorylation de GSK3 α/β aux sérines 21/9 dans les différentes structures cérébrales est responsable du déficit du filtrage sensorimoteur ainsi que de la diminution des capacités sociales chez les souris Akt3 KO.

Puisque le traitement chronique au lithium a permis de normaliser les comportements associés à la dépression et l'anxiété chez les souris Akt3 KO, cela suggère que le mécanisme moléculaire sous-jacent l'effet thérapeutique du lithium est intact chez ces souris. En revanche, nos résultats ne permettent pas de confirmer par quel moyen le traitement chronique au lithium, au niveau biochimique, augmente la phosphorylation des GSK3 α/β . Le lithium est un inhibiteur compétitif du magnésium et peut directement inhiber l'activité catalytique ATP-Mg²⁺ dépendante de la protéine GSK3. D'un autre côté, de manière indirecte, le lithium peut aussi inhiber l'activité de GSK3 par l'entremise de l'inhibition de la protéine phosphatase-2A ou par l'augmentation de l'activité d'Akt (Pan, Lewis et al. 2011, Freland and Beaulieu 2012). En effet, une étude chez la souris a démontré que l'isoforme Akt1 est essentielle à l'effet bénéfique du lithium sur les comportements reliés aux émotions (Pan, Lewis et al. 2011). Nos résultats indiquent que

le niveau total de la protéine Akt1 demeure intact chez les souris déficientes en Akt3. Ainsi, il est possible que la normalisation du comportement par le lithium démontré dans mes études soit modulée par l'isoforme Akt1 chez les souris Akt3 KO. À l'instar du lithium, d'autres composés pharmacologiques, utilisés en milieu clinique pour traiter les maladies psychiatriques comme la schizophrénie et les troubles de l'humeur, modulent l'activité de la protéine GSK3. En effet, l'administration chronique d'antipsychotiques comme l'halopéridol, l'olanzapine, le rispéridone, le quétiapine, la clozapine et la ziprasidone est reconnue pour augmenter les niveaux de GSK3 β phosphorylée dans différentes structures du cerveau (Emamian, Hall et al. 2004, Alimohamad, Rajakumar et al. 2005, Li, Rosborough et al. 2007, Roh, Seo et al. 2007). Dans le même ordre d'idée, un traitement avec l'antiépileptique valproate ou lamotrigine inhibe l'activité de GSK3 β en plus d'induire des effets anxiolytiques ainsi qu'antidépresseurs (Del'Guidice, Latapy et al. 2015). Dans cette optique, il serait intéressant d'évaluer la capacité de ces différents composés pharmacologiques à renverser les troubles de l'émotion observés chez les souris Akt3 KO et de vérifier l'impact sur la modulation de GSK3.

Un autre substrat d'importance d'Akt est la protéine mTOR. Il a été souligné dans plusieurs études que cette protéine et ses voies de signalisation puissent être impliquées dans les maladies psychiatriques (Costa-Mattioli and Monteggia 2013). À titre d'exemple, des études réalisées chez des sujets dépressifs décédés illustrent une diminution de l'expression de mTOR et de ses cibles moléculaires au niveau du cortex préfrontal (Jernigan, Goswami et al. 2011, Goswami, Jernigan et al. 2013). Une autre étude montre que l'inhibition de l'hyperactivité de mTOR avec de la rapamycine permet de normaliser des comportements associés à la schizophrénie chez des souris DISC1 knockdown (Zhou, Li et al. 2013). De manière intéressante, certains auteurs montrent une implication conjointe des protéines Akt et mTOR dans diverses conditions expérimentales reliées aux maladies psychiatriques. Des analyses réalisées sur le sang de patients bipolaires qui ne prennent aucune médication montrent que l'expression des protéines Akt1 et mTOR est considérablement réduite (Machado-Vieira, Zanetti et al. 2015). Chez la souris, la délétion de la protéine Rictor, une composante essentielle à la formation de mTORC2, a pour effet de diminuer la phosphorylation d'Akt à la sérine 473 et d'induire un déficit du filtrage

sensorimoteur (Siuta, Robertson et al. 2010). Ainsi, nous ne pouvons pas exclure la participation de la signalisation Akt3-mTOR dans l'endophénotype observé chez les souris Akt3 KO.

Un dérèglement au niveau du développement cérébral ou de l'intégrité structurale des différentes régions du cerveau a souvent été soulevé dans les causes possibles de maladies psychiatriques. Par exemple, dans de nombreux modèles animaux de dépression ou d'anxiété, il est possible d'observer des altérations structurales, une perte de la densité synaptique et une réduction du nombre de neurones (Goldwater, Pavlides et al. 2009, Christoffel, Golden et al. 2011, Hill, Hillard et al. 2011, Martin and Wellman 2011). Chez l'humain, plusieurs études associent la croissance, le volume ainsi que l'architecture cellulaire de différentes régions cérébrales à l'étiologie des pathologies comme la dépression et la schizophrénie (Wright, Rabe-Hesketh et al. 2000, Chana, Landau et al. 2003, van Tol, van der Wee et al. 2010, Wise, Radua et al. 2017). La protéine Akt est reconnue pour jouer un rôle dans la croissance et le développement cellulaire (Wang, 2017). Spécifiquement, deux études distinctes démontrent que la délétion d'Akt3 résulte en la formation d'un cerveau plus petit causée par une diminution du nombre et de la taille des neurones (Easton, Cho et al. 2005, Tschopp, Yang et al. 2005). Quelques études cliniques ont déjà suggéré que des mutations au niveau du gène codant la protéine Akt3 puissent être associées au développement d'un cerveau de taille anormale. À titre d'exemple, des individus ayant une délétion pour Akt3 souffrent de microcéphalie (Boland, Clayton-Smith et al. 2007), tandis que des mutations dupliquant ou augmentant l'activité d'Akt3 sont associées au syndrome de megalencéphalie et à la dysplasie corticale (Wang, Zeesman et al. 2013, Chung, Eydoux et al. 2014). Toutefois, il semblerait qu'Akt3 ne soit pas l'unique responsable de ces observations cliniques (Raun N, 2017). De plus, les principaux symptômes relevés de ces cas cliniques sont des troubles de la parole et un léger retard mental (Gai D, 2015). Ainsi, même s'il est possible que l'endophénotype observé chez les souris Akt3 KO résulte d'un cerveau plus petit, des études subséquentes sont nécessaires afin de valider cette hypothèse.

6.5 Les protéines Akt3-GSK3 : la mémoire et la plasticité synaptique à l'hippocampe

À l'hippocampe, la protéine Akt participe à la mémorisation de certaines formes d'apprentissage et participe à certains mécanismes de la plasticité synaptique (Hou and Klann 2004, Sui, Wang et al. 2008, Balu, Carlson et al. 2012). De plus, il est connu qu'une diminution du niveau de phosphorylation sur les sérines inhibitrices de GSK3 implique une augmentation de l'activité de cette kinase (Freland and Beaulieu 2012) et l'activité de cette protéine a déjà été associée à certaines formes de mémoire ainsi qu'à certains processus de plasticité synaptique au niveau de l'hippocampe (Peineau, Taghibiglou et al. 2007). Nos résultats biochimiques mettent en évidence que la délétion d'Akt3 induit une diminution de la phosphorylation des sérines inhibitrices 21/9 de GSK3 au niveau de l'hippocampe. À la lumière des évidences de la littérature et de nos résultats biochimiques, il était permis de croire que les souris Akt3 KO auraient développé des anomalies comportementales associées à la mémoire et que certains processus de plasticité synaptique à l'hippocampe auraient pu être altérés. Pourtant, nos résultats mettent en évidence, par l'entremise du labyrinthe de Morris et d'un test de reconnaissance des objets, que les processus de navigation spatiale et la mémoire de reconnaissance sont intacts chez les souris Akt3 KO. Ces processus sont connus pour nécessiter l'implication de l'hippocampe (Broadbent, Squire et al. 2004, Vann and Albasser 2011). De plus, nos résultats électrophysiologiques abondent dans le même sens que nos résultats comportementaux, suggérant que la signalisation d'Akt3 n'est pas essentielle aux processus de plasticité synaptique à l'hippocampe. En effet, nos résultats issus d'expériences électrophysiologiques réalisées dans la région CA1 de l'hippocampe sont comparables entre les souris Akt3 KO et les souris de phénotype sauvage. En accord avec nos résultats, une étude récente a examiné plus en détail le rôle d'Akt3 dans les processus de plasticité synaptique. Les auteurs démontrent que les processus de transmission synaptique de base, que la potentialisation à court terme ainsi que la potentialisation à long terme sont intactes chez les souris Akt3 KO (Levenga, Wong et al. 2017). Au niveau biochimique, les auteurs de cette étude illustrent, dans le même sens que nos résultats, que la délétion d'Akt3 induit une diminution de la phosphorylation des sérines inhibitrices de GSK3 au niveau de l'hippocampe (Levenga, Wong et al. 2017). Une autre étude

supporte, indirectement, les résultats obtenus. En utilisant des souris ayant subi une mutation permettant de bloquer la phosphorylation des sérines inhibitrices de GSK3 et dont la phosphorylation de GSK3 sur ces sérines inhibitrices est drastiquement réduite, les auteurs montrent que la LTP de la région CA1 de l'hippocampe n'est pas altérée chez ces souris (Polter, Beurel et al. 2010). Ainsi, nos résultats, joints à ceux de la littérature, mettent en évidence que la signalisation d'Akt3/GSK3 n'est pas impliquée à la régulation de comportements et aux mécanismes de LTP à l'hippocampe.

6.6 Diversités fonctionnelles dans la modulation du comportement chez la souris par les isoformes d'Akt

À ce jour, il n'y a pas d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques à un seul isoforme d'Akt. Ainsi, une meilleure compréhension de l'implication des différentes isoformes d'Akt dans la régulation du comportement et dans les fonctions cérébrales est possible grâce à l'utilisation de souris KO. La délétion d'Akt1 chez la souris n'a aucun impact en ce qui a trait aux fonctions motrices et aucun comportement anxieux n'est observé chez ces souris (Lai, Xu et al.). Cependant, la délétion d'Akt1 induit des anomalies en ce qui concerne la mémoire de travail, la mémoire spatiale ainsi que la mémoire liée au conditionnement de la peur (Lai, Xu et al. , Balu, Carlson et al. 2012). Parallèlement, des études électrophysiologiques à l'hippocampe ont démontré une diminution substantielle de la LTP chez les souris Akt1 KO (Balu, Carlson et al. 2012, Levenga, Wong et al. 2017). En ce qui concerne les souris Akt2 KO, celles-ci développeraient un endophénotype associé à l'anxiété et la dépression (Leibrock, Ackermann et al. 2013). Dans la même étude citée précédemment, il est démontré que l'isoforme Akt2 n'est pas impliquée dans les processus de plasticité synaptique à l'hippocampe (Levenga, Wong et al. 2017). Enfin, les résultats présentés dans cette thèse montrent que les souris Akt3 KO, qui ont une croissance normale et aucune anomalie au niveau du métabolisme glucidique (Easton, Cho et al. 2005, Tschopp, Yang et al. 2005), n'ont pas de troubles moteurs et de troubles comportementaux liés à l'hippocampe. Toutefois, les souris Akt3 KO développent des anomalies comportementales retrouvées dans la schizophrénie, la dépression et l'anxiété. Au niveau biochimique, il est intéressant de noter qu'il ne

semble pas avoir de mécanisme de compensation associé à la perte d'une isoforme, puisque la délétion d'une isoforme d'Akt n'induit pas la traduction des autres isoformes (Cho, Mu et al. 2001, Cho, Thorvaldsen et al. 2001, Easton, Cho et al. 2005, Tschopp, Yang et al. 2005). En accord, nos résultats révèlent que la délétion d'Akt3 n'induit aucun effet sur le niveau total des protéines Akt1 et Akt2 mesuré dans le cortex préfrontal, le striatum, l'hippocampe et le cervelet des souris Akt3 KO. À la lumière des études comportementales et électrophysiologiques, il apparaît que seule la protéine Akt1 est impliquée dans des fonctions liées à l'hippocampe. Il est possible que l'activité d'Akt1 soit plus importante dans cette structure cérébrale que les autres isoformes et c'est ce qui pourrait expliquer en partie nos résultats chez les souris Akt3 KO. En ce qui a trait aux souris Akt2 KO, elles expriment un phénotype lié à l'anxiété et à la dépression, comme les souris Akt3 KO. Il est intéressant de noter qu'il y a de plus en plus de liens entre la dérégulation du métabolisme glucidique, la dérégulation de l'activité d'Akt et les maladies psychiatriques (Ryan, Collins et al. 2003). Puisque les souris Akt2 KO développent un phénotype diabétique, il est difficile de déterminer si les résultats comportementaux sont la résultante de la délétion d'Akt2 ou l'effet du phénotype diabétique. Enfin, nos résultats ainsi que les résultats issus de ces différentes études examinant l'impact de la délétion d'une isoforme d'Akt chez la souris illustrent qu'il y a une modulation différentielle des comportements entre ces isoformes.

6.7 Conclusion générale

Les travaux présentés dans cette thèse mettent en évidence l'implication des protéines Akt3, GSK3 et mTOR dans la régulation de comportements liés aux émotions, à la mémoire et à la motricité. D'une part, les travaux de recherche présentés proposent que les protéines Akt3, GSK3 et mTOR ne modulent pas les habiletés motrices en condition physiologique. En effet, autant la délétion de la protéine Akt3 que différents types d'inhibition de la protéine mTOR n'ont aucun effet sur la capacité des souris à exécuter des mouvements fluides et coordonnés. Mes travaux, associés à ceux du laboratoire, mettent en relief que les protéines Akt3, GSK3 et mTOR participent aux processus moléculaires impliqués dans l'apprentissage et la mémorisation d'une nouvelle

tâche motrice complexe de manière différentielle. Plus précisément, puisque l'inhibition de l'activité de la protéine mTOR induit un retard d'apprentissage moteur, les résultats présentés dans cette thèse montrent que la signalisation de mTORC1, au striatum, est importante à la consolidation d'un nouvel apprentissage moteur. D'autre part, ces travaux de recherche proposent que la protéine Akt3 n'est pas essentielle à différents comportements associés à l'hippocampe, mais est plutôt importante à la régulation de comportements qui sont altérés dans les maladies psychiatriques, dont la schizophrénie, l'anxiété et la dépression. De plus, les résultats mettent en évidence, par l'utilisation du lithium chez les souris Akt3 KO, que la protéine GSK3 est associée à la manifestation des comportements anormaux associés à l'anxiété et la dépression.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aartsma-Rus, A. and M. van Putten (2014). "Assessing functional performance in the mdx mouse model." J Vis Exp(85).
- Al-Hasani, R., J. G. McCall, G. Shin, A. M. Gomez, G. P. Schmitz, J. M. Bernardi, C. O. Pyo, S. I. Park, C. M. Marcinkiewicz, N. A. Crowley, M. J. Krashes, B. B. Lowell, T. L. Kash, J. A. Rogers and M. R. Bruchas (2015). "Distinct Subpopulations of Nucleus Accumbens Dynorphin Neurons Drive Aversion and Reward." Neuron **87**(5): 1063-1077.
- Albouy, G., S. Fogel, H. Pottiez, V. A. Nguyen, L. Ray, O. Lungu, J. Carrier, E. Robertson and J. Doyon (2013). "Daytime sleep enhances consolidation of the spatial but not motoric representation of motor sequence memory." PLoS One **8**(1): e52805.
- Albouy, G., B. R. King, P. Maquet and J. Doyon (2013). "Hippocampus and striatum: dynamics and interaction during acquisition and sleep-related motor sequence memory consolidation." Hippocampus **23**(11): 985-1004.
- Albouy, G., V. Sterpenich, E. Balteau, G. Vandewalle, M. Desseilles, T. Dang-Vu, A. Darsaud, P. Ruby, P. H. Luppi, C. Degueldre, P. Peigneux, A. Luxen and P. Maquet (2008). "Both the hippocampus and striatum are involved in consolidation of motor sequence memory." Neuron **58**(2): 261-272.
- Albouy, G., V. Sterpenich, G. Vandewalle, A. Darsaud, S. Gais, G. Rauchs, M. Desseilles, M. Boly, T. Dang-Vu, E. Balteau, C. Degueldre, C. Phillips, A. Luxen and P. Maquet (2012). "Neural correlates of performance variability during motor sequence acquisition." Neuroimage **60**(1): 324-331.
- Alessi, D. R., S. R. James, C. P. Downes, A. B. Holmes, P. R. Gaffney, C. B. Reese and P. Cohen (1997). "Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha." Curr Biol **7**(4): 261-269.
- Alexander, G. E., M. R. DeLong and P. L. Strick (1986). "Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex." Annu Rev Neurosci **9**: 357-381.
- Alimohamad, H., N. Rajakumar, Y. H. Seah and W. Rushlow (2005). "Antipsychotics alter the protein expression levels of beta-catenin and GSK-3 in the rat medial prefrontal cortex and striatum." Biol Psychiatry **57**(5): 533-542.

- Andreasen, N. C. (1989). "The Scale for the Assessment of Negative Symptoms (SANS): conceptual and theoretical foundations." Br J Psychiatry Suppl(7): 49-58.
- Andreasen, N. C. and S. Olsen (1982). "Negative v positive schizophrenia. Definition and validation." Arch Gen Psychiatry **39**(7): 789-794.
- Antion, M. D., M. Merhav, C. A. Hoeffer, G. Reis, S. C. Kozma, G. Thomas, E. M. Schuman, K. Rosenblum and E. Klann (2008). "Removal of S6K1 and S6K2 leads to divergent alterations in learning, memory, and synaptic plasticity." Learn Mem **15**(1): 29-38.
- Antunes, M. and G. Biala (2012). "The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications." Cogn Process **13**(2): 93-110.
- Arber, S. and R. M. Costa (2018). "Connecting neuronal circuits for movement." Science **360**(6396): 1403-1404.
- Arencibia, J. M., D. Pastor-Flores, A. F. Bauer, J. O. Schulze and R. M. Biondi (2013). "AGC protein kinases: from structural mechanism of regulation to allosteric drug development for the treatment of human diseases." Biochim Biophys Acta **1834**(7): 1302-1321.
- Baik, J. H. (2013). "Dopamine signaling in reward-related behaviors." Front Neural Circuits **7**: 152.
- Balevich, E. C., M. M. Haznedar, E. Wang, R. E. Newmark, R. Bloom, J. S. Schneiderman, J. Aronowitz, C. Y. Tang, K. W. Chu, W. Byne, M. S. Buchsbaum and E. A. Hazlett (2015). "Corpus callosum size and diffusion tensor anisotropy in adolescents and adults with schizophrenia." Psychiatry Res **231**(3): 244-251.
- Balu, D. T., G. C. Carlson, K. Talbot, H. Kazi, T. E. Hill-Smith, R. M. Easton, M. J. Birnbaum and I. Lucki (2012). "Akt1 deficiency in schizophrenia and impairment of hippocampal plasticity and function." Hippocampus **22**(2): 230-240.
- Banko, J. L., M. Merhav, E. Stern, N. Sonenberg, K. Rosenblum and E. Klann (2007). "Behavioral alterations in mice lacking the translation repressor 4E-BP2." Neurobiol Learn Mem **87**(2): 248-256.
- Banko, J. L., F. Poulin, L. Hou, C. T. DeMaria, N. Sonenberg and E. Klann (2005). "The translation repressor 4E-BP2 is critical for eIF4F complex formation, synaptic plasticity, and memory in the hippocampus." J Neurosci **25**(42): 9581-9590.

- Bateup, H. S., P. Svenningsson, M. Kuroiwa, S. Gong, A. Nishi, N. Heintz and P. Greengard (2008). "Cell type-specific regulation of DARPP-32 phosphorylation by psychostimulant and antipsychotic drugs." Nat Neurosci **11**(8): 932-939.
- Beaulieu, J. M. and R. R. Gainetdinov (2011). "The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors." Pharmacol Rev **63**(1): 182-217.
- Beaulieu, J. M., R. R. Gainetdinov and M. G. Caron (2009). "Akt/GSK3 signaling in the action of psychotropic drugs." Annu Rev Pharmacol Toxicol **49**: 327-347.
- Beaulieu, J. M., T. D. Sotnikova, S. Marion, R. J. Lefkowitz, R. R. Gainetdinov and M. G. Caron (2005). "An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior." Cell **122**(2): 261-273.
- Beaulieu, J. M., T. D. Sotnikova, W. D. Yao, L. Kockeritz, J. R. Woodgett, R. R. Gainetdinov and M. G. Caron (2004). "Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(14): 5099-5104.
- Beaulieu, J. M., X. Zhang, R. M. Rodriguiz, T. D. Sotnikova, M. J. Cools, W. C. Wetsel, R. R. Gainetdinov and M. G. Caron (2008). "Role of GSK3 beta in behavioral abnormalities induced by serotonin deficiency." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(4): 1333-1338.
- Beaumont, V., N. Zhong, R. Fletcher, R. C. Froemke and R. S. Zucker (2001). "Phosphorylation and local presynaptic protein synthesis in calcium- and calcineurin-dependent induction of crayfish long-term facilitation." Neuron **32**(3): 489-501.
- Beckley, J. T., S. Laguesse, K. Phamluong, N. Morisot, S. A. Wegner and D. Ron (2016). "The First Alcohol Drink Triggers mTORC1-Dependent Synaptic Plasticity in Nucleus Accumbens Dopamine D1 Receptor Neurons." J Neurosci **36**(3): 701-713.
- Bekinschtein, P., C. Katze, L. N. Slipczuk, L. M. Igaz, M. Cammarota, I. Izquierdo and J. H. Medina (2007). "mTOR signaling in the hippocampus is necessary for memory formation." Neurobiol Learn Mem **87**(2): 303-307.
- Belelovsky, K., H. Kaphzan, A. Elkobi and K. Rosenblum (2009). "Biphasic activation of the mTOR pathway in the gustatory cortex is correlated with and necessary for taste learning." J Neurosci **29**(23): 7424-7431.
- Belovicova, K., E. Bogi, K. Csatosova and M. Dubovicky (2017). "Animal tests for anxiety-like and depression-like behavior in rats." Interdiscip Toxicol **10**(1): 40-43.

- Benarroch, E. E. (2009). "The locus ceruleus norepinephrine system: functional organization and potential clinical significance." Neurology **73**(20): 1699-1704.
- Berger, M., J. A. Gray and B. L. Roth (2009). "The expanded biology of serotonin." Annu Rev Med **60**: 355-366.
- Bergeron, Y., L. Chagniel, G. Bureau, G. Massicotte and M. Cyr (2014). "mTOR signaling contributes to motor skill learning in mice." Front Mol Neurosci **7**: 26.
- Beugnet, A., A. R. Tee, P. M. Taylor and C. G. Proud (2003). "Regulation of targets of mTOR (mammalian target of rapamycin) signalling by intracellular amino acid availability." Biochem J **372**(Pt 2): 555-566.
- Beurel, E., S. F. Grieco and R. S. Jope (2015). "Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases." Pharmacol Ther **148**: 114-131.
- Beurel, E., L. Song and R. S. Jope (2011). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 is necessary for the rapid antidepressant effect of ketamine in mice." Mol Psychiatry **16**(11): 1068-1070.
- Bhardwaj, S. K., M. Baharnoori, B. Sharif-Askari, A. Kamath, S. Williams and L. K. Srivastava (2009). "Behavioral characterization of dysbindin-1 deficient sandy mice." Behav Brain Res **197**(2): 435-441.
- Bibb, J. A., G. L. Snyder, A. Nishi, Z. Yan, L. Meijer, A. A. Fienberg, L. H. Tsai, Y. T. Kwon, J. A. Girault, A. J. Czernik, R. L. Huganir, H. C. Hemmings, Jr., A. C. Nairn and P. Greengard (1999). "Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons." Nature **402**(6762): 669-671.
- Billings, J. L., S. L. Gordon, T. Rawling, P. A. Doble, A. I. Bush, P. A. Adlard, D. I. Finkelstein and D. J. Hare (2019). "l-3,4-dihydroxyphenylalanine (l-DOPA) modulates brain iron, dopaminergic neurodegeneration and motor dysfunction in iron overload and mutant alpha-synuclein mouse models of Parkinson's disease." J Neurochem **150**(1): 88-106.
- Birnbaum, S. G., A. W. Varga, L. L. Yuan, A. E. Anderson, J. D. Sweatt and L. A. Schrader (2004). "Structure and function of Kv4-family transient potassium channels." Physiol Rev **84**(3): 803-833.
- Bliss, T. V. and G. L. Collingridge (1993). "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus." Nature **361**(6407): 31-39.
- Bliss, T. V. and S. F. Cooke (2011). "Long-term potentiation and long-term depression: a clinical perspective." Clinics (Sao Paulo) **66 Suppl 1**: 3-17.

- Bliss, T. V. and T. Lomo (1973). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." J Physiol **232**(2): 331-356.
- Blume, S. R., D. K. Cass and K. Y. Tseng (2009). "Stepping test in mice: a reliable approach in determining forelimb akinesia in MPTP-induced Parkinsonism." Exp Neurol **219**(1): 208-211.
- Blundell, J., M. Kouser and C. M. Powell (2008). "Systemic inhibition of mammalian target of rapamycin inhibits fear memory reconsolidation." Neurobiol Learn Mem **90**(1): 28-35.
- Bockaert, J. and P. Marin (2015). "mTOR in Brain Physiology and Pathologies." Physiol Rev **95**(4): 1157-1187.
- Boland, E., J. Clayton-Smith, V. G. Woo, S. McKee, F. D. Manson, L. Medne, E. Zackai, E. A. Swanson, D. Fitzpatrick, K. J. Millen, E. H. Sherr, W. B. Dobyns and G. C. Black (2007). "Mapping of deletion and translocation breakpoints in 1q44 implicates the serine/threonine kinase AKT3 in postnatal microcephaly and agenesis of the corpus callosum." Am J Hum Genet **81**(2): 292-303.
- Bonnavion, P., E. P. Fernandez, C. Varin and A. de Kerchove d'Exaerde (2019). "It takes two to tango: Dorsal direct and indirect pathways orchestration of motor learning and behavioral flexibility." Neurochem Int **124**: 200-214.
- Bostan, A. C. and P. L. Strick (2018). "The basal ganglia and the cerebellum: nodes in an integrated network." Nat Rev Neurosci **19**(6): 338-350.
- Bourin, M. and M. Hascoet (2003). "The mouse light/dark box test." Eur J Pharmacol **463**(1-3): 55-65.
- Bowling, H., G. Zhang, A. Bhattacharya, L. M. Perez-Cuesta, K. Deinhardt, C. A. Hoeffler, T. A. Neubert, W. B. Gan, E. Klann and M. V. Chao (2014). "Antipsychotics activate mTORC1-dependent translation to enhance neuronal morphological complexity." Sci Signal **7**(308): ra4.
- Brady, S. T., G. J. Siegel, R. W. Albers and D. L. Price (2012). Basic neurochemistry: principles of molecular, cellular and medical neurobiology. Amsterdam; Boston, Academic Press.
- Braff, D. L., M. A. Geyer, G. A. Light, J. Sprock, W. Perry, K. S. Cadenhead and N. R. Swerdlow (2001). "Impact of prepulse characteristics on the detection of sensorimotor gating deficits in schizophrenia." Schizophr Res **49**(1-2): 171-178.

- Bredt, D. S. and R. A. Nicoll (2003). "AMPA receptor trafficking at excitatory synapses." Neuron **40**(2): 361-379.
- Broadbent, N. J., L. R. Squire and R. E. Clark (2004). "Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(40): 14515-14520.
- Brooks, S. P. and S. B. Dunnett (2009). "Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide." Nat Rev Neurosci **10**(7): 519-529.
- Brugnoli, A., F. Napolitano, A. Usiello and M. Morari (2016). "Genetic deletion of Rhes or pharmacological blockade of mTORC1 prevent striato-nigral neurons activation in levodopa-induced dyskinesia." Neurobiol Dis **85**: 155-163.
- Buitrago, M. M., J. B. Schulz, J. Dichgans and A. R. Luft (2004). "Short and long-term motor skill learning in an accelerated rotarod training paradigm." Neurobiol Learn Mem **81**(3): 211-216.
- Bureau, G., M. Carrier, M. Lebel and M. Cyr (2010). "Intrastriatal inhibition of extracellular signal-regulated kinases impaired the consolidation phase of motor skill learning." Neurobiol Learn Mem **94**(1): 107-115.
- Burgess, S., J. Geddes, K. Hawton, E. Townsend, K. Jamison and G. Goodwin (2001). "Lithium for maintenance treatment of mood disorders." Cochrane Database Syst Rev(2): CD003013.
- Cao, V. Y., Y. Ye, S. Mastwal, M. Ren, M. Coon, Q. Liu, R. M. Costa and K. H. Wang (2015). "Motor Learning Consolidates Arc-Expressing Neuronal Ensembles in Secondary Motor Cortex." Neuron **86**(6): 1385-1392.
- Cardinal, R. N., J. A. Parkinson, J. Hall and B. J. Everitt (2002). "Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex." Neurosci Biobehav Rev **26**(3): 321-352.
- Carlson, G. C., K. Talbot, T. B. Halene, M. J. Gandal, H. A. Kazi, L. Schlosser, Q. H. Phung, R. E. Gur, S. E. Arnold and S. J. Siegel (2011). "Dysbindin-1 mutant mice implicate reduced fast-phasic inhibition as a final common disease mechanism in schizophrenia." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(43): E962-970.
- Carroll, M., O. Warren, X. Fan and W. S. Sossin (2004). "5-HT stimulates eEF2 dephosphorylation in a rapamycin-sensitive manner in Aplysia neurites." J Neurochem **90**(6): 1464-1476.

- Cazorla, M., F. D. de Carvalho, M. O. Chohan, M. Shegda, N. Chuhma, S. Rayport, S. E. Ahmari, H. Moore and C. Kellendonk (2014). "Dopamine D2 receptors regulate the anatomical and functional balance of basal ganglia circuitry." Neuron **81**(1): 153-164.
- Cerovic, M., R. d'Isa, R. Tonini and R. Brambilla (2013). "Molecular and cellular mechanisms of dopamine-mediated behavioral plasticity in the striatum." Neurobiol Learn Mem **105**: 63-80.
- Chagniel, L., Y. Bergeron, G. Bureau, G. Massicotte and M. Cyr (2014). "Regulation of tyrosine phosphatase STEP61 by protein kinase A during motor skill learning in mice." PLoS One **9**(1): e86988.
- Chana, G., S. Landau, C. Beasley, I. P. Everall and D. Cotter (2003). "Two-dimensional assessment of cytoarchitecture in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder, bipolar disorder, and schizophrenia: evidence for decreased neuronal somal size and increased neuronal density." Biol Psychiatry **53**(12): 1086-1098.
- Chen, W. S., P. Z. Xu, K. Gottlob, M. L. Chen, K. Sokol, T. Shiyanova, I. Roninson, W. Weng, R. Suzuki, K. Tobe, T. Kadowaki and N. Hay (2001). "Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene." Genes Dev **15**(17): 2203-2208.
- Cho, H., J. Mu, J. K. Kim, J. L. Thorvaldsen, Q. Chu, E. B. Crenshaw, 3rd, K. H. Kaestner, M. S. Bartolomei, G. I. Shulman and M. J. Birnbaum (2001). "Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta)." Science **292**(5522): 1728-1731.
- Cho, H., J. L. Thorvaldsen, Q. Chu, F. Feng and M. J. Birnbaum (2001). "Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice." J Biol Chem **276**(42): 38349-38352.
- Christie, G. R., E. Hajduch, H. S. Hundal, C. G. Proud and P. M. Taylor (2002). "Intracellular sensing of amino acids in *Xenopus laevis* oocytes stimulates p70 S6 kinase in a target of rapamycin-dependent manner." J Biol Chem **277**(12): 9952-9957.
- Christoffel, D. J., S. A. Golden and S. J. Russo (2011). "Structural and synaptic plasticity in stress-related disorders." Rev Neurosci **22**(5): 535-549.
- Chuhma, N., S. Mingote, A. Kalmbach, L. Yetnikoff and S. Rayport (2017). "Heterogeneity in Dopamine Neuron Synaptic Actions Across the Striatum and Its Relevance for Schizophrenia." Biol Psychiatry **81**(1): 43-51.

- Chung, B. K., P. Eydoux, C. D. Van Karnebeek and W. T. Gibson (2014). "Duplication of AKT3 is associated with macrocephaly and speech delay." Am J Med Genet A **164A**(7): 1868-1869.
- Cohen, P. (1979). "The hormonal control of glycogen metabolism in mammalian muscle by multivalent phosphorylation." Biochem Soc Trans **7**(3): 459-480.
- Cohen, P. and S. Frame (2001). "The renaissance of GSK3." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(10): 769-776.
- Conn, P. J., G. Battaglia, M. J. Marino and F. Nicoletti (2005). "Metabotropic glutamate receptors in the basal ganglia motor circuit." Nat Rev Neurosci **6**(10): 787-798.
- Conn, P. J. and J. P. Pin (1997). "Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors." Annu Rev Pharmacol Toxicol **37**: 205-237.
- Contestabile, A., B. Greco, D. Ghezzi, V. Tucci, F. Benfenati and L. Gasparini (2013). "Lithium rescues synaptic plasticity and memory in Down syndrome mice." J Clin Invest **123**(1): 348-361.
- Costa-Mattioli, M. and L. M. Monteggia (2013). "mTOR complexes in neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders." Nat Neurosci **16**(11): 1537-1543.
- Costa, R. M., D. Cohen and M. A. Nicolelis (2004). "Differential corticostriatal plasticity during fast and slow motor skill learning in mice." Curr Biol **14**(13): 1124-1134.
- Coyle, J. T. (2006). "Glutamate and schizophrenia: beyond the dopamine hypothesis." Cell Mol Neurobiol **26**(4-6): 365-384.
- Crawley, J. N. (2008). "Behavioral phenotyping strategies for mutant mice." Neuron **57**(6): 809-818.
- Crino, P. B. (2016). "The mTOR signalling cascade: paving new roads to cure neurological disease." Nat Rev Neurol **12**(7): 379-392.
- Cryan, J. F., C. Mombereau and A. Vassout (2005). "The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice." Neurosci Biobehav Rev **29**(4-5): 571-625.
- D'Amours, G., G. Bureau, M. J. Boily and M. Cyr (2011). "Differential gene expression profiling in the mouse brain during motor skill learning: focus on the striatum structure." Behav Brain Res **221**(1): 108-117.

- Dadalko, O. I., M. Siuta, A. Poe, K. Erreger, H. J. Matthies, K. Niswender and A. Galli (2015). "mTORC2/rictor signaling disrupts dopamine-dependent behaviors via defects in striatal dopamine neurotransmission." J Neurosci **35**(23): 8843-8854.
- David, D. J. and A. M. Gardier (2016). "[The pharmacological basis of the serotonin system: Application to antidepressant response]." Encephale **42**(3): 255-263.
- Davis, H. P. and L. R. Squire (1984). "Protein synthesis and memory: a review." Psychol Bull **96**(3): 518-559.
- Davis, M. E. (2016). "Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment." Clin J Oncol Nurs **20**(5 Suppl): S2-8.
- Dayan, E. and L. G. Cohen (2011). "Neuroplasticity subserving motor skill learning." Neuron **72**(3): 443-454.
- De Sarno, P., X. Li and R. S. Jope (2002). "Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylation by sodium valproate and lithium." Neuropharmacology **43**(7): 1158-1164.
- Deffains, M. and H. Bergman (2015). "Striatal cholinergic interneurons and cortico-striatal synaptic plasticity in health and disease." Mov Disord **30**(8): 1014-1025.
- Deffains, M., L. Iskhakova and H. Bergman (2016). "Stop and Think about Basal Ganglia Functional Organization: The Pallido-Striatal "Stop" Route." Neuron **89**(2): 237-239.
- Del'Guidice, T., C. Latapy, A. Rampino, J. Khlghatyan, M. Lemasson, B. Gelao, T. Quarto, G. Rizzo, A. Barbeau, C. Lamarre, A. Bertolino, G. Blasi and J. M. Beaulieu (2015). "FXR1P is a GSK3beta substrate regulating mood and emotion processing." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(33): E4610-4619.
- Deli, A., K. Schipany, M. Rosner, H. Hoyer, A. Pollak, L. Li, M. Hengstschlager and G. Lubec (2012). "Blocking mTORC1 activity by rapamycin leads to impairment of spatial memory retrieval but not acquisition in C57BL/6J mice." Behav Brain Res **229**(2): 320-324.
- Denninger, J. K., B. M. Smith and E. D. Kirby (2018). "Novel Object Recognition and Object Location Behavioral Testing in Mice on a Budget." J Vis Exp(141).
- Depienne, C., C. Nava, B. Keren, S. Heide, A. Rastetter, S. Passemard, S. Chantot-Bastaraud, M. L. Moutard, P. B. Agrawal, G. VanNoy, J. M. Stoler, D. J. Amor, T. Billette de Villemeur, D. Doummar et al. (2017). "Genetic and phenotypic dissection of 1q43q44 microdeletion syndrome and neurodevelopmental phenotypes associated with mutations in ZBTB18 and HNRNPU." Hum Genet **136**(4): 463-479.

- Dickman, D. K. and G. W. Davis (2009). "The schizophrenia susceptibility gene dysbindin controls synaptic homeostasis." Science **326**(5956): 1127-1130.
- Diez, H., J. J. Garrido and F. Wandosell (2012). "Specific Roles of Akt iso Forms in Apoptosis and Axon Growth Regulation in Neurons." Plos One **7**(4).
- Diez, H., J. J. Garrido and F. Wandosell (2012). "Specific roles of Akt iso forms in apoptosis and axon growth regulation in neurons." PLoS One **7**(4): e32715.
- Dingledine, R., K. Borges, D. Bowie and S. F. Traynelis (1999). "The glutamate receptor ion channels." Pharmacol Rev **51**(1): 7-61.
- Doble, B. W. and J. R. Woodgett (2003). "GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase." J Cell Sci **116**(Pt 7): 1175-1186.
- Doyon, J., P. Bellec, R. Amsel, V. Penhune, O. Monchi, J. Carrier, S. Lehericy and H. Benali (2009). "Contributions of the basal ganglia and functionally related brain structures to motor learning." Behav Brain Res **199**(1): 61-75.
- Doyon, J. and H. Benali (2005). "Reorganization and plasticity in the adult brain during learning of motor skills." Curr Opin Neurobiol **15**(2): 161-167.
- Doyon, J., P. Orban, M. Barakat, K. Debas, O. Lungu, G. Albouy, S. Fogel, S. Proulx, S. Laventure, J. Deslauriers, C. Duchesne, J. Carrier and H. Benali (2011). "[Functional brain plasticity associated with motor learning]." Med Sci (Paris) **27**(4): 413-420.
- Duman, R. S. and B. Voleti (2012). "Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents." Trends Neurosci **35**(1): 47-56.
- Duman, R. S. and B. Voleti (2012). "Signaling pathways underlying the pathophysiology and treatment of depression: novel mechanisms for rapid-acting agents." Trends in Neurosciences **35**(1): 47-56.
- Dummler, B., O. Tschopp, D. Hynx, Z. Z. Yang, S. Dirnhofer and B. A. Hemmings (2006). "Life with a single isoform of Akt: mice lacking Akt2 and Akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies." Mol Cell Biol **26**(21): 8042-8051.
- Durieux, P. F., S. N. Schiffmann and A. de Kerchove d'Exaerde (2012). "Differential regulation of motor control and response to dopaminergic drugs by D1R and D2R neurons in distinct dorsal striatum subregions." EMBO J **31**(3): 640-653.

- Easton, R. M., H. Cho, K. Roovers, D. W. Shineman, M. Mizrahi, M. S. Forman, V. M. Lee, M. Szabolcs, R. de Jong, T. Oltersdorf, T. Ludwig, A. Efstratiadis and M. J. Birnbaum (2005). "Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size." Mol Cell Biol **25**(5): 1869-1878.
- Elghazi, L., N. Balcazar and E. Bernal-Mizrachi (2006). "Emerging role of protein kinase B/Akt signaling in pancreatic beta-cell mass and function." Int J Biochem Cell Biol **38**(2): 157-163.
- Emamian, E. S. (2012). "AKT/GSK3 signaling pathway and schizophrenia." Front Mol Neurosci **5**: 33.
- Emamian, E. S., D. Hall, M. J. Birnbaum, M. Karayiorgou and J. A. Gogos (2004). "Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3beta signaling in schizophrenia." Nat Genet **36**(2): 131-137.
- Fabi, F. and E. Asselin (2014). "Expression, activation, and role of AKT isoforms in the uterus." Reproduction **148**(5): R85-95.
- Fasano, S., A. D'Antoni, P. C. Orban, E. Valjent, E. Putignano, H. Vara, T. Pizzorusso, M. Giustetto, B. Yoon, P. Soloway, R. Maldonado, J. Caboche and R. Brambilla (2009). "Ras-guanine nucleotide-releasing factor 1 (Ras-GRF1) controls activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling in the striatum and long-term behavioral responses to cocaine." Biol Psychiatry **66**(8): 758-768.
- Feng, J., J. Park, P. Cron, D. Hess and B. A. Hemmings (2004). "Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase." J Biol Chem **279**(39): 41189-41196.
- Fenton, T. R. and I. T. Gout (2011). "Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases." Int J Biochem Cell Biol **43**(1): 47-59.
- Fischer, K. E., J. A. Gelfond, V. Y. Soto, C. Han, S. Someya, A. Richardson and S. N. Austad (2015). "Health Effects of Long-Term Rapamycin Treatment: The Impact on Mouse Health of Enteric Rapamycin Treatment from Four Months of Age throughout Life." PLoS One **10**(5): e0126644.
- Frankle, W. G. and M. Laruelle (2002). "Neuroreceptor imaging in psychiatric disorders." Ann Nucl Med **16**(7): 437-446.
- Freland, L. and J. M. Beaulieu (2012). "Inhibition of GSK3 by lithium, from single molecules to signaling networks." Front Mol Neurosci **5**: 14.

- Gafford, G. M., R. G. Parsons and F. J. Helmstetter (2011). "Consolidation and reconsolidation of contextual fear memory requires mammalian target of rapamycin-dependent translation in the dorsal hippocampus." Neuroscience **182**: 98-104.
- Gai, D., E. Haan, M. Scholar, J. Nicholl and S. Yu (2015). "Phenotypes of AKT3 deletion: a case report and literature review." Am J Med Genet A **167A**(1): 174-179.
- Gainetdinov, R. R., T. D. Sotnikova and M. G. Caron (2002). "Monoamine transporter pharmacology and mutant mice." Trends Pharmacol Sci **23**(8): 367-373.
- Gainetdinov, R. R., W. C. Wetsel, S. R. Jones, E. D. Levin, M. Jaber and M. G. Caron (1999). "Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity." Science **283**(5400): 397-401.
- Galvan, A., A. Devergnas and T. Wichmann (2015). "Alterations in neuronal activity in basal ganglia-thalamocortical circuits in the parkinsonian state." Front Neuroanat **9**: 5.
- Galvao-Ferreira, P., M. Lipinski, F. Santos, A. Barco and R. M. Costa (2017). "Skill Learning Modulates RNA Pol II Poising at Immediate Early Genes in the Adult Striatum." eNeuro **4**(2).
- Gangarossa, G., L. Ceolin, A. Paucard, M. Lerner-Natoli, J. Perroy, L. Fagni and E. Valjent (2014). "Repeated stimulation of dopamine D1-like receptor and hyperactivation of mTOR signaling lead to generalized seizures, altered dentate gyrus plasticity, and memory deficits." Hippocampus **24**(12): 1466-1481.
- Garofalo, R. S., S. J. Orena, K. Rafidi, A. J. Torchia, J. L. Stock, A. L. Hildebrandt, T. Coskran, S. C. Black, D. J. Brees, J. R. Wicks, J. D. McNeish and K. G. Coleman (2003). "Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta." J Clin Invest **112**(2): 197-208.
- Gheysen, F., F. Van Opstal, C. Roggeman, H. Van Waelvelde and W. Fias (2010). "Hippocampal contribution to early and later stages of implicit motor sequence learning." Exp Brain Res **202**(4): 795-807.
- Gittis, A. H. and A. C. Kreitzer (2012). "Striatal microcircuitry and movement disorders." Trends Neurosci **35**(9): 557-564.
- Glasgow, N. G., B. Siegler Retchless and J. W. Johnson (2014). "Molecular bases of NMDA receptor subtype-dependent properties." J Physiol.

- Glover, E. M., K. J. Ressler and M. Davis (2010). "Differing effects of systemically administered rapamycin on consolidation and reconsolidation of context vs. cued fear memories." Learn Mem **17**(11): 577-581.
- Goberdhan, D. C., C. Wilson and A. L. Harris (2016). "Amino Acid Sensing by mTORC1: Intracellular Transporters Mark the Spot." Cell Metab **23**(4): 580-589.
- Goldwater, D. S., C. Pavlides, R. G. Hunter, E. B. Bloss, P. R. Hof, B. S. McEwen and J. H. Morrison (2009). "Structural and functional alterations to rat medial prefrontal cortex following chronic restraint stress and recovery." Neuroscience **164**(2): 798-808.
- Gonzalez, G. A. and M. R. Montminy (1989). "Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133." Cell **59**(4): 675-680.
- Goswami, D. B., C. S. Jernigan, A. Chandran, A. H. Iyo, W. L. May, M. C. Austin, C. A. Stockmeier and B. Karolewicz (2013). "Gene expression analysis of novel genes in the prefrontal cortex of major depressive disorder subjects." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **43**: 126-133.
- Gould, T. D. and H. Einat (2007). "Animal models of bipolar disorder and mood stabilizer efficacy: a critical need for improvement." Neurosci Biobehav Rev **31**(6): 825-831.
- Gould, T. D., K. C. O'Donnell, A. M. Picchini and H. K. Manji (2007). "Strain differences in lithium attenuation of d-amphetamine-induced hyperlocomotion: a mouse model for the genetics of clinical response to lithium." Neuropsychopharmacology **32**(6): 1321-1333.
- Graber, T. E., P. K. McCamphill and W. S. Sossin (2013). "A recollection of mTOR signaling in learning and memory." Learn Mem **20**(10): 518-530.
- Graybiel, A. M. and S. T. Grafton (2015). "The striatum: where skills and habits meet." Cold Spring Harb Perspect Biol **7**(8): a021691.
- Greengard, P. (2001). "The neurobiology of dopamine signaling." Biosci Rep **21**(3): 247-269.
- Greengard, P., P. B. Allen and A. C. Nairn (1999). "Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade." Neuron **23**(3): 435-447.
- Grillner, S. (2018). "The Enigmatic "Indirect Pathway" of the Basal Ganglia: A New Role." Neuron **99**(6): 1105-1107.

- Gronli, J., J. Soule and C. R. Bramham (2013). "Sleep and protein synthesis-dependent synaptic plasticity: impacts of sleep loss and stress." Front Behav Neurosci **7**: 224.
- Guo, H. F. and Y. Zhong (2006). "Requirement of Akt to mediate long-term synaptic depression in *Drosophila*." J Neurosci **26**(15): 4004-4014.
- Hara, K., Y. Maruki, X. Long, K. Yoshino, N. Oshiro, S. Hidayat, C. Tokunaga, J. Avruch and K. Yonezawa (2002). "Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action." Cell **110**(2): 177-189.
- Harrison, P. J. and A. J. Law (2006). "Neuregulin 1 and schizophrenia: genetics, gene expression, and neurobiology." Biol Psychiatry **60**(2): 132-140.
- Hayashi, T. (1952). "A physiological study of epileptic seizures following cortical stimulation in animals and its application to human clinics." Jpn J Physiol **3**(1): 46-64.
- Hemmings, H. C., Jr., P. Greengard, H. Y. Tung and P. Cohen (1984). "DARPP-32, a dopamine-regulated neuronal phosphoprotein, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1." Nature **310**(5977): 503-505.
- Henry, J. P. and D. Scherman (1989). "Radioligands of the vesicular monoamine transporter and their use as markers of monoamine storage vesicles." Biochem Pharmacol **38**(15): 2395-2404.
- Hernandez-Lopez, S., T. Tkatch, E. Perez-Garci, E. Galarraga, J. Bargas, H. Hamm and D. J. Surmeier (2000). "D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca²⁺ currents and excitability via a novel PLC[β 1]-IP3-calcineurin-signaling cascade." J Neurosci **20**(24): 8987-8995.
- Hernandez, F., E. Langa, R. Cuadros, J. Avila and N. Villanueva (2010). "Regulation of GSK3 isoforms by phosphatases PP1 and PP2A." Mol Cell Biochem **344**(1-2): 211-215.
- Hers, I., E. E. Vincent and J. M. Tavaré (2011). "Akt signalling in health and disease." Cell Signal **23**(10): 1515-1527.
- Hill, M. N., C. J. Hillard and B. S. McEwen (2011). "Alterations in corticolimbic dendritic morphology and emotional behavior in cannabinoid CB1 receptor-deficient mice parallel the effects of chronic stress." Cereb Cortex **21**(9): 2056-2064.
- Ho, V. M., J. A. Lee and K. C. Martin (2011). "The cell biology of synaptic plasticity." Science **334**(6056): 623-628.

- Hoeffler, C. A. and E. Klann (2010). "mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease." Trends Neurosci **33**(2): 67-75.
- Hooper, C., V. Markevich, F. Plattner, R. Killick, E. Schofield, T. Engel, F. Hernandez, B. Anderton, K. Rosenblum, T. Bliss, S. F. Cooke, J. Avila, J. J. Lucas, K. P. Giese, J. Stephenson and S. Lovestone (2007). "Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation." Eur J Neurosci **25**(1): 81-86.
- Hou, L. and E. Klann (2004). "Activation of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin signaling pathway is required for metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression." J Neurosci **24**(28): 6352-6361.
- Howes, O. D. and S. Kapur (2009). "The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III--the final common pathway." Schizophr Bull **35**(3): 549-562.
- Hsiung, S. C., M. Adlersberg, V. Arango, J. J. Mann, H. Tamir and K. P. Liu (2003). "Attenuated 5-HT1A receptor signaling in brains of suicide victims: involvement of adenylyl cyclase, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt and mitogen-activated protein kinase." J Neurochem **87**(1): 182-194.
- Huang, W., P. J. Zhu, S. Zhang, H. Zhou, L. Stoica, M. Galiano, K. Krnjevic, G. Roman and M. Costa-Mattioli (2013). "mTORC2 controls actin polymerization required for consolidation of long-term memory." Nat Neurosci **16**(4): 441-448.
- Ikeda, M., N. Iwata, T. Suzuki, T. Kitajima, Y. Yamanouchi, Y. Kinoshita, T. Inada and N. Ozaki (2004). "Association of AKT1 with schizophrenia confirmed in a Japanese population." Biol Psychiatry **56**(9): 698-700.
- Inkster, B., T. E. Nichols, P. G. Saemann, D. P. Auer, F. Holsboer, P. Muglia and P. M. Matthews (2009). "Association of GSK3beta polymorphisms with brain structural changes in major depressive disorder." Arch Gen Psychiatry **66**(7): 721-728.
- Inoki, K., Y. Li, T. Xu and K. L. Guan (2003). "Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling." Genes Dev **17**(15): 1829-1834.
- Jernigan, C. S., D. B. Goswami, M. C. Austin, A. H. Iyo, A. Chandran, C. A. Stockmeier and B. Karolewicz (2011). "The mTOR signaling pathway in the prefrontal cortex is compromised in major depressive disorder." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **35**(7): 1774-1779.

- Jobim, P. F., T. R. Pedroso, R. R. Christoff, A. Werenicz, N. Maurmann, G. K. Reolon and R. Roesler (2012). "Inhibition of mTOR by rapamycin in the amygdala or hippocampus impairs formation and reconsolidation of inhibitory avoidance memory." Neurobiol Learn Mem **97**(1): 105-112.
- Johnson, J. W. and P. Ascher (1987). "Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons." Nature **325**(6104): 529-531.
- Jope, R. S., C. J. Yuskaitis and E. Beurel (2007). "Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics." Neurochem Res **32**(4-5): 577-595.
- Kaidanovich-Beilin, O., T. Lipina, I. Vukobradovic, J. Roder and J. R. Woodgett (2011). "Assessment of social interaction behaviors." J Vis Exp(48).
- Kaidanovich-Beilin, O., T. V. Lipina, K. Takao, M. van Eede, S. Hattori, C. Laliberte, M. Khan, K. Okamoto, J. W. Chambers, P. J. Fletcher, K. MacAulay, B. W. Doble, M. Henkelman, T. Miyakawa, J. Roder and J. R. Woodgett (2009). "Abnormalities in brain structure and behavior in GSK-3 α mutant mice." Mol Brain **2**: 35.
- Kaidanovich-Beilin, O. and J. R. Woodgett (2011). "GSK-3: Functional Insights from Cell Biology and Animal Models." Front Mol Neurosci **4**: 40.
- Kaizuka, T., T. Hara, N. Oshiro, U. Kikkawa, K. Yonezawa, K. Takehana, S. Iemura, T. Natsume and N. Mizushima (2010). "Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly." J Biol Chem **285**(26): 20109-20116.
- Kandel, E. R. (2012). "The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB." Mol Brain **5**: 14.
- Kandel, E. R., Y. Dudai and M. R. Mayford (2014). "The molecular and systems biology of memory." Cell **157**(1): 163-186.
- Kandel, E. R., J. H. Schwartz, T. M. Jessell, S. A. Siegelbaum and A. J. Hudspeth (2013). Principles of neural science.
- Kapfhamer, D., K. H. Berger, F. W. Hopf, T. Seif, V. Kharazia, A. Bonci and U. Heberlein (2010). "Protein Phosphatase 2a and glycogen synthase kinase 3 signaling modulate prepulse inhibition of the acoustic startle response by altering cortical M-Type potassium channel activity." J Neurosci **30**(26): 8830-8840.

- Karege, F., N. Perroud, S. Burkhardt, M. Schwald, E. Ballmann, R. La Harpe and A. Malafosse (2007). "Alteration in kinase activity but not in protein levels of protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 β in ventral prefrontal cortex of depressed suicide victims." Biol Psychiatry **61**(2): 240-245.
- Karege, F., N. Perroud, F. Schurhoff, A. Meary, G. Marillier, S. Burkhardt, E. Ballmann, R. Fernandez, S. Jamain, M. Leboyer, R. La Harpe and A. Malafosse (2010). "Association of AKT1 gene variants and protein expression in both schizophrenia and bipolar disorder." Genes Brain Behav **9**(5): 503-511.
- Kedrov, A. V., M. Durymanov and K. V. Anokhin (2019). "The Arc gene: Retroviral heritage in cognitive functions." Neurosci Biobehav Rev **99**: 275-281.
- Kelley, A. E. (2004). "Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning." Neurosci Biobehav Rev **27**(8): 765-776.
- Kennedy, B. K. and D. W. Lamming (2016). "The Mechanistic Target of Rapamycin: The Grand ConducTOR of Metabolism and Aging." Cell Metab **23**(6): 990-1003.
- Kessler, R. C., W. T. Chiu, O. Demler, K. R. Merikangas and E. E. Walters (2005). "Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication." Arch Gen Psychiatry **62**(6): 617-627.
- Kim, D. H., D. D. Sarbassov, S. M. Ali, J. E. King, R. R. Latek, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst and D. M. Sabatini (2002). "mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery." Cell **110**(2): 163-175.
- Kim, J. and K. L. Guan (2019). "mTOR as a central hub of nutrient signalling and cell growth." Nat Cell Biol **21**(1): 63-71.
- Kim, L. C., R. S. Cook and J. Chen (2017). "mTORC1 and mTORC2 in cancer and the tumor microenvironment." Oncogene **36**(16): 2191-2201.
- Kim, Y. T., E. M. Hur, W. D. Snider and F. Q. Zhou (2011). "Role of GSK3 Signaling in Neuronal Morphogenesis." Front Mol Neurosci **4**: 48.
- King, M. K. and R. S. Jope (2013). "Lithium treatment alleviates impaired cognition in a mouse model of fragile X syndrome." Genes Brain Behav **12**(7): 723-731.
- Kitagishi, Y., M. Kobayashi, K. Kikuta and S. Matsuda (2012). "Roles of PI3K/AKT/GSK3/mTOR Pathway in Cell Signaling of Mental Illnesses." Depress Res Treat **2012**: 752563.

- Klein, M. O., D. S. Battagello, A. R. Cardoso, D. N. Hauser, J. C. Bittencourt and R. G. Correa (2019). "Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases." Cell Mol Neurobiol **39**(1): 31-59.
- Klein, P. S. and D. A. Melton (1996). "A molecular mechanism for the effect of lithium on development." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(16): 8455-8459.
- Klug, J. R., B. N. Mathur, T. L. Kash, H. D. Wang, R. T. Matthews, A. J. Robison, M. E. Anderson, A. Y. Deutch, D. M. Lovinger, R. J. Colbran and D. G. Winder (2012). "Genetic inhibition of CaMKII in dorsal striatal medium spiny neurons reduces functional excitatory synapses and enhances intrinsic excitability." PLoS One **7**(9): e45323.
- Komada, M., K. Takao and T. Miyakawa (2008). "Elevated plus maze for mice." J Vis Exp(22).
- Krakauer, J. W., A. M. Hadjiosif, J. Xu, A. L. Wong and A. M. Haith (2019). "Motor Learning." Compr Physiol **9**(2): 613-663.
- Kravitz, A. V. and A. C. Kreitzer (2012). "Striatal mechanisms underlying movement, reinforcement, and punishment." Physiology (Bethesda) **27**(3): 167-177.
- Krishnan, V., M. H. Han, M. Mazei-Robison, S. D. Iniguez, J. L. Ables, V. Vialou, O. Berton, S. Ghose, H. E. Covington, 3rd, M. D. Wiley, R. P. Henderson, R. L. Neve, A. J. Eisch, C. A. Tamminga, S. J. Russo, C. A. Bolanos and E. J. Nestler (2008). "AKT signaling within the ventral tegmental area regulates cellular and behavioral responses to stressful stimuli." Biol Psychiatry **64**(8): 691-700.
- Kupchik, Y. M., R. M. Brown, J. A. Heinsbroek, M. K. Lobo, D. J. Schwartz and P. W. Kalivas (2015). "Coding the direct/indirect pathways by D1 and D2 receptors is not valid for accumbens projections." Nat Neurosci **18**(9): 1230-1232.
- Kuroda, K., S. Yamada, M. Tanaka, M. Iizuka, H. Yano, D. Mori, D. Tsuboi, T. Nishioka, T. Namba, Y. Iizuka, S. Kubota, T. Nagai, D. Ibi, R. Wang, A. Enomoto, M. Isotani-Sakakibara, N. Asai, K. Kimura, H. Kiyonari, T. Abe, A. Mizoguchi, M. Sokabe, M. Takahashi, K. Yamada and K. Kaibuchi (2011). "Behavioral alterations associated with targeted disruption of exons 2 and 3 of the *Disc1* gene in the mouse." Hum Mol Genet **20**(23): 4666-4683.
- Lai, W. S., B. Xu, K. G. Westphal, M. Paterlini, B. Olivier, P. Pavlidis, M. Karayiorgou and J. A. Gogos (2006). "Akt1 deficiency affects neuronal morphology and predisposes to abnormalities in prefrontal cortex functioning." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(45): 16906-16911.

- Lametti, D. R. and K. E. Watkins (2016). "Cognitive Neuroscience: The Neural Basis of Motor Learning by Observing." Curr Biol **26**(7): R288-290.
- Lamming, D. W., L. Ye, P. Katajisto, M. D. Goncalves, M. Saitoh, D. M. Stevens, J. G. Davis, A. B. Salmon, A. Richardson, R. S. Ahima, D. A. Guertin, D. M. Sabatini and J. A. Baur (2012). "Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity." Science **335**(6076): 1638-1643.
- Lamprecht, R. and J. LeDoux (2004). "Structural plasticity and memory." Nat Rev Neurosci **5**(1): 45-54.
- Lanciego, J. L., N. Luquin and J. A. Obeso (2012). "Functional neuroanatomy of the basal ganglia." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(12): a009621.
- Laplane, M. and D. M. Sabatini (2009). "mTOR signaling at a glance." J Cell Sci **122**(Pt 20): 3589-3594.
- Laplane, M. and D. M. Sabatini (2012). "mTOR signaling in growth control and disease." Cell **149**(2): 274-293.
- Latapy, C., V. Rioux, M. J. Guitton and J. M. Beaulieu (2012). "Selective deletion of forebrain glycogen synthase kinase 3 β reveals a central role in serotonin-sensitive anxiety and social behaviour." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **367**(1601): 2460-2474.
- Lau, K. F., C. C. Miller, B. H. Anderton and P. C. Shaw (1999). "Expression analysis of glycogen synthase kinase-3 in human tissues." J Pept Res **54**(1): 85-91.
- Laurier-Laurin, M. E., A. De Montigny, S. Attiori Essis, M. Cyr and G. Massicotte (2014). "Blockade of lysosomal acid ceramidase induces GluN2B-dependent Tau phosphorylation in rat hippocampal slices." Neural Plast **2014**: 196812.
- Lavigne, N., N. Ethier, J. N. Oak, L. Pei, F. Liu, P. Trieu, R. V. Rebois, M. Bouvier, T. E. Hebert and H. H. Van Tol (2002). "G protein-coupled receptors form stable complexes with inwardly rectifying potassium channels and adenylyl cyclase." J Biol Chem **277**(48): 46010-46019.
- Lee, J. H., M. Huynh, J. L. Silhavy, S. Kim, T. Dixon-Salazar, A. Heiberg, E. Scott, V. Bafna, K. J. Hill, A. Collazo, V. Funari, C. Russ, S. B. Gabriel, G. W. Mathern and J. G. Gleeson (2012). "De novo somatic mutations in components of the PI3K-AKT3-mTOR pathway cause hemimegalencephaly." Nat Genet **44**(8): 941-945.

- Lehericy, S., H. Benali, P. F. Van de Moortele, M. Pelegrini-Issac, T. Waechter, K. Ugurbil and J. Doyon (2005). "Distinct basal ganglia territories are engaged in early and advanced motor sequence learning." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(35): 12566-12571.
- Leibrock, C., T. F. Ackermann, M. Hierlmeier, F. Lang, S. Borgwardt and U. E. Lang (2013). "Akt2 deficiency is associated with anxiety and depressive behavior in mice." Cell Physiol Biochem **32**(3): 766-777.
- Lerma, J., R. S. Zukin and M. V. Bennett (1990). "Glycine decreases desensitization of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors expressed in *Xenopus* oocytes and is required for NMDA responses." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(6): 2354-2358.
- Leroux, A. E., J. O. Schulze and R. M. Biondi (2018). "AGC kinases, mechanisms of regulation and innovative drug development." Semin Cancer Biol **48**: 1-17.
- Leroy, K. and J. P. Brion (1999). "Developmental expression and localization of glycogen synthase kinase-3beta in rat brain." J Chem Neuroanat **16**(4): 279-293.
- Levenga, J., H. Wong, R. A. Milstead, B. N. Keller, L. E. LaPlante and C. A. Hoeffer (2017). "AKT isoforms have distinct hippocampal expression and roles in synaptic plasticity." Elife **6**.
- Lezak, K. R., G. Missig and W. A. Carlezon, Jr. (2017). "Behavioral methods to study anxiety in rodents." Dialogues Clin Neurosci **19**(2): 181-191.
- Li, G., R. E. Anderson, H. Tomita, R. Adler, X. Liu, D. J. Zack and R. V. Rajala (2007). "Nonredundant role of Akt2 for neuroprotection of rod photoreceptor cells from light-induced cell death." J Neurosci **27**(1): 203-211.
- Li, X., A. B. Friedman, W. Zhu, L. Wang, S. Boswell, R. S. May, L. L. Davis and R. S. Jope (2007). "Lithium regulates glycogen synthase kinase-3beta in human peripheral blood mononuclear cells: implication in the treatment of bipolar disorder." Biol Psychiatry **61**(2): 216-222.
- Li, X., M. A. Frye and R. C. Shelton (2012). "Review of pharmacological treatment in mood disorders and future directions for drug development." Neuropsychopharmacology **37**(1): 77-101.
- Li, X. and R. S. Jope (2010). "Is glycogen synthase kinase-3 a central modulator in mood regulation?" Neuropsychopharmacology **35**(11): 2143-2154.

- Li, X., K. M. Rosborough, A. B. Friedman, W. Zhu and K. A. Roth (2007). "Regulation of mouse brain glycogen synthase kinase-3 by atypical antipsychotics." Int J Neuropsychopharmacol **10**(1): 7-19.
- Li, X., W. Zhu, M. S. Roh, A. B. Friedman, K. Rosborough and R. S. Jope (2004). "In vivo regulation of glycogen synthase kinase-3beta (GSK3beta) by serotonergic activity in mouse brain." Neuropsychopharmacology **29**(8): 1426-1431.
- Lipina, T. V., O. Kaidanovich-Beilin, S. Patel, M. Wang, S. J. Clapcote, F. Liu, J. R. Woodgett and J. C. Roder (2011). "Genetic and pharmacological evidence for schizophrenia-related Disc1 interaction with GSK-3." Synapse **65**(3): 234-248.
- Liu, F., X. H. Ma, J. Ule, J. A. Bibb, A. Nishi, A. J. DeMaggio, Z. Yan, A. C. Nairn and P. Greengard (2001). "Regulation of cyclin-dependent kinase 5 and casein kinase I by metabotropic glutamate receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(20): 11062-11068.
- Liu, F., D. M. Virshup, A. C. Nairn and P. Greengard (2002). "Mechanism of regulation of casein kinase I activity by group I metabotropic glutamate receptors." J Biol Chem **277**(47): 45393-45399.
- Liu, Z. H., D. M. Chuang and C. B. Smith (2011). "Lithium ameliorates phenotypic deficits in a mouse model of fragile X syndrome." Int J Neuropsychopharmacol **14**(5): 618-630.
- Lu, W., Y. Shi, A. C. Jackson, K. Bjorgan, M. J. During, R. Sprengel, P. H. Seeburg and R. A. Nicoll (2009). "Subunit composition of synaptic AMPA receptors revealed by a single-cell genetic approach." Neuron **62**(2): 254-268.
- Lueptow, L. M. (2017). "Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice." J Vis Exp(126).
- Luft, A. R., M. M. Buitrago, T. Ringer, J. Dichgans and J. B. Schulz (2004). "Motor skill learning depends on protein synthesis in motor cortex after training." J Neurosci **24**(29): 6515-6520.
- Ma, T. M., S. Abazyan, B. Abazyan, J. Nomura, C. Yang, S. Seshadri, A. Sawa, S. H. Snyder and M. V. Pletnikov (2013). "Pathogenic disruption of DISC1-serine racemase binding elicits schizophrenia-like behavior via D-serine depletion." Mol Psychiatry **18**(5): 557-567.
- Ma, X. M. and J. Blenis (2009). "Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control." Nat Rev Mol Cell Biol **10**(5): 307-318.

- Machado-Vieira, R., M. V. Zanetti, A. L. Teixeira, M. Uno, L. L. Valiengo, M. G. Soeiro-de-Souza, S. M. Oba-Shinjo, R. T. de Sousa, C. A. Zarate, Jr., W. F. Gattaz and S. K. Marie (2015). "Decreased AKT1/mTOR pathway mRNA expression in short-term bipolar disorder." Eur Neuropsychopharmacol **25**(4): 468-473.
- Malenka, R. C. and R. A. Nicoll (1993). "NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms." Trends Neurosci **16**(12): 521-527.
- Malhi, G. S. and M. Tanious (2011). "Optimal frequency of lithium administration in the treatment of bipolar disorder: clinical and dosing considerations." CNS Drugs **25**(4): 289-298.
- Mameli, M., B. Balland, R. Lujan and C. Luscher (2007). "Rapid synthesis and synaptic insertion of GluR2 for mGluR-LTD in the ventral tegmental area." Science **317**(5837): 530-533.
- Manago, F., M. Mereu, S. Mastwal, R. Mastrogiacomio, D. Scheggia, M. Emanuele, M. A. De Luca, D. R. Weinberger, K. H. Wang and F. Papaleo (2016). "Genetic Disruption of Arc/Arg3.1 in Mice Causes Alterations in Dopamine and Neurobehavioral Phenotypes Related to Schizophrenia." Cell Rep **16**(8): 2116-2128.
- Manning, B. D. and L. C. Cantley (2007). "AKT/PKB signaling: navigating downstream." Cell **129**(7): 1261-1274.
- Manning, B. D. and A. Toker (2017). "AKT/PKB Signaling: Navigating the Network." Cell **169**(3): 381-405.
- Mao, L., Q. Tang, S. Samdani, Z. Liu and J. Q. Wang (2004). "Regulation of MAPK/ERK phosphorylation via ionotropic glutamate receptors in cultured rat striatal neurons." Eur J Neurosci **19**(5): 1207-1216.
- Mao, Y., X. Ge, C. L. Frank, J. M. Madison, A. N. Koehler, M. K. Doud, C. Tassa, E. M. Berry, T. Soda, K. K. Singh, T. Biechele, T. L. Petryshen, R. T. Moon, S. J. Haggarty and L. H. Tsai (2009). "Disrupted in schizophrenia 1 regulates neuronal progenitor proliferation via modulation of GSK3beta/beta-catenin signaling." Cell **136**(6): 1017-1031.
- Martin, K. P. and C. L. Wellman (2011). "NMDA receptor blockade alters stress-induced dendritic remodeling in medial prefrontal cortex." Cereb Cortex **21**(10): 2366-2373.
- Martineau, Y., D. Muller and S. Pyronnet (2014). "Targeting protein synthesis in cancer cells." Oncoscience **1**(7): 484-485.

- Mayer, M. L., G. L. Westbrook and P. B. Guthrie (1984). "Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurones." Nature **309**(5965): 261-263.
- McGrath, J., S. Saha, D. Chant and J. Welham (2008). "Schizophrenia: a concise overview of incidence, prevalence, and mortality." Epidemiol Rev **30**: 67-76.
- Menard, C. and R. Quirion (2012). "Group 1 metabotropic glutamate receptor function and its regulation of learning and memory in the aging brain." Front Pharmacol **3**: 182.
- Miao, L., L. Yang, H. Huang, F. Liang, C. Ling and Y. Hu (2016). "mTORC1 is necessary but mTORC2 and GSK3beta are inhibitory for AKT3-induced axon regeneration in the central nervous system." Elife **5**: e14908.
- Mikell, C. B. and G. M. McKhann (2010). "Regulation of parkinsonian motor behaviors by optogenetic control of Basal Ganglia circuitry." Neurosurgery **67**(4): N28-29.
- Mines, M. A., C. J. Yuskaitis, M. K. King, E. Beurel and R. S. Jope (2010). "GSK3 influences social preference and anxiety-related behaviors during social interaction in a mouse model of fragile X syndrome and autism." PLoS One **5**(3): e9706.
- Monaco, S. A., B. R. Ferguson and W. J. Gao (2018). "Lithium Inhibits GSK3beta and Augments GluN2A Receptor Expression in the Prefrontal Cortex." Front Cell Neurosci **12**: 16.
- Mukhopadhyay, S., M. A. Frias, A. Chatterjee, P. Yellen and D. A. Foster (2016). "The Enigma of Rapamycin Dosage." Mol Cancer Ther **15**(3): 347-353.
- Mundi, P. S., J. Sachdev, C. McCourt and K. Kalinsky (2016). "AKT in cancer: new molecular insights and advances in drug development." Br J Clin Pharmacol **82**(4): 943-956.
- Mure, H., K. Matsuzaki, K. T. Kitazato, Y. Mizobuchi, K. Kuwayama, T. Kageji and S. Nagahiro (2010). "Akt2 and Akt3 play a pivotal role in malignant gliomas." Neuro Oncol **12**(3): 221-232.
- Murphy, B. P., Y. C. Chung, T. W. Park and P. D. McGorry (2006). "Pharmacological treatment of primary negative symptoms in schizophrenia: a systematic review." Schizophr Res **88**(1-3): 5-25.

- Nagamani, S. C., A. Erez, C. Bay, A. Pettigrew, S. R. Lalani, K. Herman, B. H. Graham, M. J. Nowaczyk, M. Proud, W. J. Craigen, B. Hopkins, B. Kozel, K. Plunkett, P. Hixson, P. Stankiewicz, A. Patel and S. W. Cheung (2012). "Delineation of a deletion region critical for corpus callosal abnormalities in chromosome 1q43-q44." Eur J Hum Genet **20**(2): 176-179.
- Nambu, A., H. Tokuno and M. Takada (2002). "Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal 'hyperdirect' pathway." Neurosci Res **43**(2): 111-117.
- Nellist, M., R. Schot, M. Hoogeveen-Westerveld, R. F. Neuteboom, E. J. van der Louw, M. H. Lequin, K. Bindels-de Heus, B. J. Sibbles, R. de Coo, A. Brooks and G. M. Mancini (2015). "Germline activating AKT3 mutation associated with megalencephaly, polymicrogyria, epilepsy and hypoglycemia." Mol Genet Metab **114**(3): 467-473.
- Nelson, A. B. and A. C. Kreitzer (2014). "Reassessing models of basal ganglia function and dysfunction." Annu Rev Neurosci **37**: 117-135.
- Nestler, E. J. and S. E. Hyman (2010). "Animal models of neuropsychiatric disorders." Nat Neurosci **13**(10): 1161-1169.
- Nestler, E. J., S. E. Hyman and R. C. Malenka (2009). Molecular neuropharmacology: a foundation for clinical neuroscience. New York, McGraw-Hill Medical.
- Nguyen, T. P., A. R. Frank and J. L. Jewell (2017). "Amino acid and small GTPase regulation of mTORC1." Cell Logist **7**(4): e1378794.
- Nicoletti, F., J. Bockaert, G. L. Collingridge, P. J. Conn, F. Ferraguti, D. D. Schoepp, J. T. Wroblewski and J. P. Pin (2011). "Metabotropic glutamate receptors: from the workbench to the bedside." Neuropharmacology **60**(7-8): 1017-1041.
- Nishi, A., J. A. Bibb, S. Matsuyama, M. Hamada, H. Higashi, A. C. Nairn and P. Greengard (2002). "Regulation of DARPP-32 dephosphorylation at PKA- and Cdk5-sites by NMDA and AMPA receptors: distinct roles of calcineurin and protein phosphatase-2A." J Neurochem **81**(4): 832-841.
- Nishi, A., G. L. Snyder and P. Greengard (1997). "Bidirectional regulation of DARPP-32 phosphorylation by dopamine." J Neurosci **17**(21): 8147-8155.
- Nitulescu, G. M., M. Van De Venter, G. Nitulescu, A. Ungurianu, P. Juzenas, Q. Peng, O. T. Olaru, D. Gradinaru, A. Tsatsakis, D. Tsoukalas, D. A. Spandidos and D. Margina (2018). "The Akt pathway in oncology therapy and beyond (Review)." Int J Oncol **53**(6): 2319-2331.

- Nonomura, S., K. Nishizawa, Y. Sakai, Y. Kawaguchi, S. Kato, M. Uchigashima, M. Watanabe, K. Yamanaka, K. Enomoto, S. Chiken, H. Sano, S. Soma, J. Yoshida, K. Samejima, M. Ogawa, K. Kobayashi, A. Nambu, Y. Isomura and M. Kimura (2018). "Monitoring and Updating of Action Selection for Goal-Directed Behavior through the Striatal Direct and Indirect Pathways." Neuron **99**(6): 1302-1314 e1305.
- O'Brien, W. T., A. D. Harper, F. Jove, J. R. Woodgett, S. Maretto, S. Piccolo and P. S. Klein (2004). "Glycogen synthase kinase-3 β haploinsufficiency mimics the behavioral and molecular effects of lithium." J Neurosci **24**(30): 6791-6798.
- O'Donnell, J., D. Zeppenfeld, E. McConnell, S. Pena and M. Nedergaard (2012). "Norepinephrine: a neuromodulator that boosts the function of multiple cell types to optimize CNS performance." Neurochem Res **37**(11): 2496-2512.
- O'Leary, O. and Y. Nolan (2015). "Glycogen synthase kinase-3 as a therapeutic target for cognitive dysfunction in neuropsychiatric disorders." CNS Drugs **29**(1): 1-15.
- O'Mahony, S. M., G. Clarke, Y. E. Borre, T. G. Dinan and J. F. Cryan (2015). "Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis." Behav Brain Res **277**: 32-48.
- O'Tuathaigh, C. M., M. Harte, C. O'Leary, G. J. O'Sullivan, C. Blau, D. Lai, R. P. Harvey, O. Tighe, A. J. Fagan, C. Kerskens, G. P. Reynolds and J. L. Waddington (2010). "Schizophrenia-related endophenotypes in heterozygous neuregulin-1 'knockout' mice." Eur J Neurosci **31**(2): 349-358.
- Oh, W. J. and E. Jacinto (2011). "mTOR complex 2 signaling and functions." Cell Cycle **10**(14): 2305-2316.
- Ouimet, B., E. Pepin, Y. Bergeron, L. Chagniel, J. M. Beaulieu, G. Massicotte and M. Cyr (2019). "Motor learning deficits and striatal GSK-3 hyperactivity in Akt3 knockout mice." Behav Neurosci **133**(1): 135-143.
- Owen, S. F., J. D. Berke and A. C. Kreitzer (2018). "Fast-Spiking Interneurons Supply Feedforward Control of Bursting, Calcium, and Plasticity for Efficient Learning." Cell **172**(4): 683-695 e615.
- Page, G., F. A. Khidir, S. Pain, L. Barrier, B. Fauconneau, O. Guillard, A. Piriou and J. Hugon (2006). "Group I metabotropic glutamate receptors activate the p70S6 kinase via both mammalian target of rapamycin (mTOR) and extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2) signaling pathways in rat striatal and hippocampal synaptoneurosome." Neurochem Int **49**(4): 413-421.

- Pan, J. Q., M. C. Lewis, J. K. Ketterman, E. L. Clore, M. Riley, K. R. Richards, E. Berry-Scott, X. Liu, F. F. Wagner, E. B. Holson, R. L. Neve, T. L. Biechele, R. T. Moon, E. M. Scolnick, T. L. Petryshen and S. J. Haggarty (2011). "AKT kinase activity is required for lithium to modulate mood-related behaviors in mice." Neuropsychopharmacology **36**(7): 1397-1411.
- Pandey, G. N., X. Ren, H. S. Rizavi and Y. Dwivedi (2010). "Glycogen synthase kinase-3 β in the platelets of patients with mood disorders: effect of treatment." J Psychiatr Res **44**(3): 143-148.
- Paoletti, P. and J. Neyton (2007). "NMDA receptor subunits: function and pharmacology." Curr Opin Pharmacol **7**(1): 39-47.
- Patel, P. and J. R. Woodgett (2017). "Glycogen Synthase Kinase 3: A Kinase for All Pathways?" Curr Top Dev Biol **123**: 277-302.
- Pause, A., G. J. Belsham, A. C. Gingras, O. Donze, T. A. Lin, J. C. Lawrence, Jr. and N. Sonenberg (1994). "Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function." Nature **371**(6500): 762-767.
- Peineau, S., C. Taghibiglou, C. Bradley, T. P. Wong, L. Liu, J. Lu, E. Lo, D. Wu, E. Saule, T. Bouschet, P. Matthews, J. T. Isaac, Z. A. Bortolotto, Y. T. Wang and G. L. Collingridge (2007). "LTP inhibits LTD in the hippocampus via regulation of GSK3 β ." Neuron **53**(5): 703-717.
- Peng, X. D., P. Z. Xu, M. L. Chen, A. Hahn-Windgassen, J. Skeen, J. Jacobs, D. Sundararajan, W. S. Chen, S. E. Crawford, K. G. Coleman and N. Hay (2003). "Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2." Genes Dev **17**(11): 1352-1365.
- Perreault, M. L., A. Hasbi, B. F. O'Dowd and S. R. George (2011). "The dopamine d1-d2 receptor heteromer in striatal medium spiny neurons: evidence for a third distinct neuronal pathway in Basal Ganglia." Front Neuroanat **5**: 31.
- Peters, A., C. Reisch and D. Langemann (2018). "LTP or LTD? Modeling the Influence of Stress on Synaptic Plasticity." eNeuro **5**(1).
- Petit-Demouliere, B., F. Chenu and M. Bourin (2005). "Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity." Psychopharmacology (Berl) **177**(3): 245-255.
- Pin, J. P. and F. Acher (2002). "The metabotropic glutamate receptors: structure, activation mechanism and pharmacology." Curr Drug Targets CNS Neurol Disord **1**(3): 297-317.

- Pin, J. P. and R. Duvoisin (1995). "The metabotropic glutamate receptors: structure and functions." Neuropharmacology **34**(1): 1-26.
- Pithadia, A. B. and S. M. Jain (2009). "5-Hydroxytryptamine Receptor Subtypes and their Modulators with Therapeutic Potentials." J Clin Med Res **1**(2): 72-80.
- Poduri, A., G. D. Evrony, X. Cai, P. C. Elhosary, R. Beroukhi, M. K. Lehtinen, L. B. Hills, E. L. Heinzen, A. Hill, R. S. Hill, B. J. Barry, B. F. Bourgeois, J. J. Riviello, A. J. Barkovich, P. M. Black, K. L. Ligon and C. A. Walsh (2012). "Somatic activation of AKT3 causes hemispheric developmental brain malformations." Neuron **74**(1): 41-48.
- Polter, A., E. Beurel, S. Yang, R. Garner, L. Song, C. A. Miller, J. D. Sweatt, L. McMahon, A. A. Bartolucci, X. Li and R. S. Jope (2010). "Deficiency in the inhibitory serine-phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 increases sensitivity to mood disturbances." Neuropsychopharmacology **35**(8): 1761-1774.
- Polter, A., S. Yang, A. A. Zmijewska, T. van Groen, J. H. Paik, R. A. Depinho, S. L. Peng, R. S. Jope and X. Li (2009). "Forkhead box, class O transcription factors in brain: regulation and behavioral manifestation." Biol Psychiatry **65**(2): 150-159.
- Pryor, W. M., M. Biagioli, N. Shahani, S. Swarnkar, W. C. Huang, D. T. Page, M. E. MacDonald and S. Subramaniam (2014). "Huntingtin promotes mTORC1 signaling in the pathogenesis of Huntington's disease." Sci Signal **7**(349): ra103.
- Purves, D. (2018). Neuroscience, Sinauer Associates is an imprint of Oxford University Press.
- Purves, D. and S. M. Williams (2004). Neuroscience. Sunderland, Mass., Sinauer Associates.
- Pytliak, M., V. Vargova, V. Mechirova and M. Felsoci (2011). "Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications." Physiol Res **60**(1): 15-25.
- Qian, Y., H. Forssberg and R. Diaz Heijtz (2015). "Motor Skill Learning Is Associated with Phase-Dependent Modifications in the Striatal cAMP/PKA/DARPP-32 Signaling Pathway in Rodents." PLoS One **10**(10): e0140974.
- Ramboz, S., R. Oosting, D. A. Amara, H. F. Kung, P. Blier, M. Mendelsohn, J. J. Mann, D. Brunner and R. Hen (1998). "Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(24): 14476-14481.
- Renoir, T. (2014). "New frontiers in the neuropsychopharmacology of mental illness." Front Pharmacol **5**: 212.

- Rial, D., A. A. Castro, N. Machado, P. Garcao, F. Q. Goncalves, H. B. Silva, A. R. Tome, A. Kofalvi, O. Corti, R. Raisman-Vozari, R. A. Cunha and R. D. Prediger (2014). "Behavioral phenotyping of Parkin-deficient mice: looking for early preclinical features of Parkinson's disease." PLoS One **9**(12): e114216.
- Richter, J. D. and N. Sonenberg (2005). "Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins." Nature **433**(7025): 477-480.
- Ripke, S., C. O'Dushlaine, K. Chambert, J. L. Moran, A. K. Kahler, S. Akterin, S. E. Bergen, A. L. Collins, J. J. Crowley, M. Fromer, Y. Kim, S. H. Lee, P. K. Magnusson, N. Sanchez, E. A. Stahl, S. Williams et al (2013). "Genome-wide association analysis identifies 13 new risk loci for schizophrenia." Nat Genet **45**(10): 1150-1159.
- Riviere, J. B., G. M. Mirzaa, B. J. O'Roak, M. Beddaoui, D. Alcantara, R. L. Conway, J. St-Onge, J. A. Schwartzentruber, K. W. Gripp, S. M. Nikkel, T. Worthylake, C. T. Sullivan, T. R. Ward et al. (2012). "De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes." Nat Genet **44**(8): 934-940.
- Roh, M. S., M. S. Seo, Y. Kim, S. H. Kim, W. J. Jeon, Y. M. Ahn, U. G. Kang, Y. S. Juhn and Y. S. Kim (2007). "Haloperidol and clozapine differentially regulate signals upstream of glycogen synthase kinase 3 in the rat frontal cortex." Exp Mol Med **39**(3): 353-360.
- Roseberry, T. K., A. M. Lee, A. L. Lalive, L. Wilbrecht, A. Bonci and A. C. Kreitzer (2016). "Cell-Type-Specific Control of Brainstem Locomotor Circuits by Basal Ganglia." Cell **164**(3): 526-537.
- Ross, C. A., R. L. Margolis, S. A. Reading, M. Pletnikov and J. T. Coyle (2006). "Neurobiology of schizophrenia." Neuron **52**(1): 139-153.
- Ruderfer, D. M., A. W. Charney, B. Readhead, B. A. Kidd, A. K. Kahler, P. J. Kenny, M. J. Keiser, J. L. Moran, C. M. Hultman, S. A. Scott, P. F. Sullivan, S. M. Purcell, J. T. Dudley and P. Sklar (2016). "Polygenic overlap between schizophrenia risk and antipsychotic response: a genomic medicine approach." Lancet Psychiatry **3**(4): 350-357.
- Ryan, M. C., P. Collins and J. H. Thakore (2003). "Impaired fasting glucose tolerance in first-episode, drug-naive patients with schizophrenia." Am J Psychiatry **160**(2): 284-289.
- Sabatini, D. M. (2017). "Twenty-five years of mTOR: Uncovering the link from nutrients to growth." Proc Natl Acad Sci U S A **114**(45): 11818-11825.

- Salcedo-Tello, P., A. Ortiz-Matamoros and C. Arias (2011). "GSK3 Function in the Brain during Development, Neuronal Plasticity, and Neurodegeneration." Int J Alzheimers Dis **2011**: 189728.
- Saldivar-Gonzalez, J. A., U. E. Campos-Rodriguez and M. A. Cano-Cruz (2009). "Differential effect of clozapine and haloperidol on rats treated with methylphenidate in the open field test." Proc West Pharmacol Soc **52**: 63-66.
- Sancak, Y., C. C. Thoreen, T. R. Peterson, R. A. Lindquist, S. A. Kang, E. Spooner, S. A. Carr and D. M. Sabatini (2007). "PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase." Mol Cell **25**(6): 903-915.
- Santini, E., M. Heiman, P. Greengard, E. Valjent and G. Fisone (2009). "Inhibition of mTOR signaling in Parkinson's disease prevents L-DOPA-induced dyskinesia." Sci Signal **2**(80): ra36.
- Sarbassov, D. D., S. M. Ali, S. Sengupta, J. H. Sheen, P. P. Hsu, A. F. Bagley, A. L. Markhard and D. M. Sabatini (2006). "Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB." Mol Cell **22**(2): 159-168.
- Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, S. M. Ali and D. M. Sabatini (2005). "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." Science **307**(5712): 1098-1101.
- Sato, A., S. Kasai, T. Kobayashi, Y. Takamatsu, O. Hino, K. Ikeda and M. Mizuguchi (2012). "Rapamycin reverses impaired social interaction in mouse models of tuberous sclerosis complex." Nat Commun **3**: 1292.
- Sawa, A. and S. H. Snyder (2002). "Schizophrenia: diverse approaches to a complex disease." Science **296**(5568): 692-695.
- Saxton, R. A. and D. M. Sabatini (2017). "mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease." Cell **168**(6): 960-976.
- Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics, C. (2014). "Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci." Nature **511**(7510): 421-427.
- Schreiber, K. H., D. Ortiz, E. C. Academia, A. C. Anies, C. Y. Liao and B. K. Kennedy (2015). "Rapamycin-mediated mTORC2 inhibition is determined by the relative expression of FK506-binding proteins." Aging Cell **14**(2): 265-273.

- Seibt, J., M. C. Dumoulin, S. J. Aton, T. Coleman, A. Watson, N. Naidoo and M. G. Frank (2012). "Protein synthesis during sleep consolidates cortical plasticity in vivo." Curr Biol **22**(8): 676-682.
- Seiden, L. S., K. E. Sabol and G. A. Ricaurte (1993). "Amphetamine: effects on catecholamine systems and behavior." Annu Rev Pharmacol Toxicol **33**: 639-677.
- Sgambato, V., C. Pages, M. Rogard, M. J. Besson and J. Caboche (1998). "Extracellular signal-regulated kinase (ERK) controls immediate early gene induction on corticostriatal stimulation." J Neurosci **18**(21): 8814-8825.
- Sharpe, M. J., T. Stalnaker, N. W. Schuck, S. Killcross, G. Schoenbaum and Y. Niv (2019). "An Integrated Model of Action Selection: Distinct Modes of Cortical Control of Striatal Decision Making." Annu Rev Psychol **70**: 53-76.
- Shiflett, M. W. and B. W. Balleine (2011). "Molecular substrates of action control in cortico-striatal circuits." Prog Neurobiol **95**(1): 1-13.
- Shonesy, B. C., N. Jalan-Sakrikar, V. S. Cavener and R. J. Colbran (2014). "CaMKII: a molecular substrate for synaptic plasticity and memory." Prog Mol Biol Transl Sci **122**: 61-87.
- Silva, A. J., J. H. Kogan, P. W. Frankland and S. Kida (1998). "CREB and memory." Annu Rev Neurosci **21**: 127-148.
- Simonyan, K. (2019). "Recent advances in understanding the role of the basal ganglia." F1000Res **8**.
- Siuta, M. A., S. D. Robertson, H. Kocalis, C. Saunders, P. J. Gresch, V. Khatri, C. Shiota, J. P. Kennedy, C. W. Lindsley, L. C. Daws, D. B. Polley, J. Veenstra-Vanderweele, G. D. Stanwood, M. A. Magnuson, K. D. Niswender and A. Galli (2010). "Dysregulation of the norepinephrine transporter sustains cortical hypodopaminergia and schizophrenia-like behaviors in neuronal rictor null mice." PLoS Biol **8**(6): e1000393.
- Soares-Cunha, C., B. Coimbra, N. Sousa and A. J. Rodrigues (2016). "Reappraising striatal D1- and D2-neurons in reward and aversion." Neurosci Biobehav Rev **68**: 370-386.
- Solinas, M., P. Belujon, P. O. Fernagut, M. Jaber and N. Thiriet (2019). "Dopamine and addiction: what have we learned from 40 years of research." J Neural Transm (Vienna) **126**(4): 481-516.

- Sommer, W. H., R. M. Costa and A. C. Hansson (2014). "Dopamine systems adaptation during acquisition and consolidation of a skill." Front Integr Neurosci **8**: 87.
- Song, M. S., L. Salmena and P. P. Pandolfi (2012). "The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor." Nat Rev Mol Cell Biol **13**(5): 283-296.
- Stambolic, V., L. Ruel and J. R. Woodgett (1996). "Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells." Curr Biol **6**(12): 1664-1668.
- Stoica, L., P. J. Zhu, W. Huang, H. Zhou, S. C. Kozma and M. Costa-Mattioli (2011). "Selective pharmacogenetic inhibition of mammalian target of Rapamycin complex I (mTORC1) blocks long-term synaptic plasticity and memory storage." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(9): 3791-3796.
- Straub, R. E., Y. Jiang, C. J. MacLean, Y. Ma, B. T. Webb, M. V. Myakishev, C. Harris-Kerr, B. Wormley, H. Sadek, B. Kadambi, A. J. Cesare, A. Gibberman, X. Wang, F. A. O'Neill, D. Walsh and K. S. Kendler (2002). "Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia." Am J Hum Genet **71**(2): 337-348.
- Sui, L., J. Wang and B. M. Li (2008). "Role of the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of the rapamycin signaling pathway in long-term potentiation and trace fear conditioning memory in rat medial prefrontal cortex." Learn Mem **15**(10): 762-776.
- Sukoff Rizzo, S. J. and J. N. Crawley (2017). "Behavioral Phenotyping Assays for Genetic Mouse Models of Neurodevelopmental, Neurodegenerative, and Psychiatric Disorders." Annu Rev Anim Biosci **5**: 371-389.
- Sutherland, C. (2011). "What Are the bona fide GSK3 Substrates?" Int J Alzheimers Dis **2011**: 505607.
- Sutton, L. P. and M. G. Caron (2015). "Essential role of D1R in the regulation of mTOR complex1 signaling induced by cocaine." Neuropharmacology **99**: 610-619.
- Svenningsson, P., A. Nishi, G. Fisone, J. A. Girault, A. C. Nairn and P. Greengard (2004). "DARPP-32: an integrator of neurotransmission." Annu Rev Pharmacol Toxicol **44**: 269-296.
- Sweatt, J. D. (2004). "Hippocampal function in cognition." Psychopharmacology (Berl) **174**(1): 99-110.

- Takagi, M., K. Dobashi, K. Nagahara, M. Kato, G. Nishimura, R. Fukuzawa, S. Narumi and T. Hasegawa (2017). "A novel de novo germline mutation Glu40Lys in AKT3 causes megalencephaly with growth hormone deficiency." Am J Med Genet A **173**(4): 1071-1076.
- Takahashi, M., K. Tomizawa, R. Kato, K. Sato, T. Uchida, S. C. Fujita and K. Imahori (1994). "Localization and developmental changes of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 beta in rat brain." J Neurochem **63**(1): 245-255.
- Takao, K. and T. Miyakawa (2006). "Light/dark transition test for mice." J Vis Exp(1): 104.
- Tang, S. J., G. Reis, H. Kang, A. C. Gingras, N. Sonenberg and E. M. Schuman (2002). "A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 467-472.
- Tee, A. R., B. D. Manning, P. P. Roux, L. C. Cantley and J. Blenis (2003). "Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb." Curr Biol **13**(15): 1259-1268.
- Thiselton, D. L., V. I. Vladimirov, P. H. Kuo, J. McClay, B. Wormley, A. Fanous, F. A. O'Neill, D. Walsh, E. J. Van den Oord, K. S. Kendler and B. P. Riley (2008). "AKT1 is associated with schizophrenia across multiple symptom dimensions in the Irish study of high density schizophrenia families." Biol Psychiatry **63**(5): 449-457.
- Thomanetz, V., N. Angliker, D. Cloetta, R. M. Lustenberger, M. Schweighauser, F. Oliveri, N. Suzuki and M. A. Ruegg (2013). "Ablation of the mTORC2 component rictor in brain or Purkinje cells affects size and neuron morphology." J Cell Biol **201**(2): 293-308.
- Thomas, G. M. and R. L. Huganir (2004). "MAPK cascade signalling and synaptic plasticity." Nat Rev Neurosci **5**(3): 173-183.
- Thomson, P. A., E. L. Malavasi, E. Grunewald, D. C. Soares, M. Borkowska and J. K. Millar (2013). "DISC1 genetics, biology and psychiatric illness." Front Biol (Beijing) **8**(1): 1-31.
- Thorn, C. A., H. Atallah, M. Howe and A. M. Graybiel (2010). "Differential dynamics of activity changes in dorsolateral and dorsomedial striatal loops during learning." Neuron **66**(5): 781-795.

- Tichelaar, W., M. Safferling, K. Keinanen, H. Stark and D. R. Madden (2004). "The Three-dimensional Structure of an Ionotropic Glutamate Receptor Reveals a Dimer-of-dimers Assembly." *J Mol Biol* **344**(2): 435-442.
- Tischmeyer, W., H. Schicknick, M. Kraus, C. I. Seidenbecher, S. Staak, H. Scheich and E. D. Gundelfinger (2003). "Rapamycin-sensitive signalling in long-term consolidation of auditory cortex-dependent memory." *Eur J Neurosci* **18**(4): 942-950.
- Tokuda, S., C. L. Mahaffey, B. Monks, C. R. Faulkner, M. J. Birnbaum, S. C. Danzer and W. N. Frankel (2011). "A novel Akt3 mutation associated with enhanced kinase activity and seizure susceptibility in mice." *Hum Mol Genet* **20**(5): 988-999.
- Tritsch, N. X. and B. L. Sabatini (2012). "Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum." *Neuron* **76**(1): 33-50.
- Tschopp, O., Z. Z. Yang, D. Brodbeck, B. A. Dummler, M. Hemmings-Mieszczak, T. Watanabe, T. Michaelis, J. Frahm and B. A. Hemmings (2005). "Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis." *Development* **132**(13): 2943-2954.
- Tsokas, P., E. A. Grace, P. Chan, T. Ma, S. C. Sealton, R. Iyengar, E. M. Landau and R. D. Blitzer (2005). "Local protein synthesis mediates a rapid increase in dendritic elongation factor 1A after induction of late long-term potentiation." *J Neurosci* **25**(24): 5833-5843.
- Tucker, L. B., A. G. Velosky and J. T. McCabe (2018). "Applications of the Morris water maze in translational traumatic brain injury research." *Neurosci Biobehav Rev* **88**: 187-200.
- Tudor, J. C., E. J. Davis, L. Peixoto, M. E. Wimmer, E. van Tilborg, A. J. Park, S. G. Poplawski, C. W. Chung, R. Havekes, J. Huang, E. Gatti, P. Pierre and T. Abel (2016). "Sleep deprivation impairs memory by attenuating mTORC1-dependent protein synthesis." *Sci Signal* **9**(425): ra41.
- Turner, K. M., Y. Sun, P. Ji, K. J. Granberg, B. Bernard, L. Hu, D. E. Cogdell, X. Zhou, O. Yli-Harja, M. Nykter, I. Shmulevich, W. K. Yung, G. N. Fuller and W. Zhang (2015). "Genomically amplified Akt3 activates DNA repair pathway and promotes glioma progression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(11): 3421-3426.
- Valjent, E., J. Caboche and P. Vanhoutte (2001). "Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase induced gene regulation in brain: a molecular substrate for learning and memory?" *Mol Neurobiol* **23**(2-3): 83-99.

- Valjent, E., V. Pascoli, P. Svenningsson, S. Paul, H. Enslen, J. C. Corvol, A. Stipanovich, J. Caboche, P. J. Lombroso, A. C. Nairn, P. Greengard, D. Herve and J. A. Girault (2005). "Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(2): 491-496.
- Valsamis, B. and S. Schmid (2011). "Habituation and prepulse inhibition of acoustic startle in rodents." J Vis Exp(55): e3446.
- van Os, J. and S. Kapur (2009). "Schizophrenia." Lancet **374**(9690): 635-645.
- van Tol, M. J., N. J. van der Wee, O. A. van den Heuvel, M. M. Nielen, L. R. Demenescu, A. Aleman, R. Renken, M. A. van Buchem, F. G. Zitman and D. J. Veltman (2010). "Regional brain volume in depression and anxiety disorders." Arch Gen Psychiatry **67**(10): 1002-1011.
- Vander Haar, E., S. I. Lee, S. Bandhakavi, T. J. Griffin and D. H. Kim (2007). "Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40." Nat Cell Biol **9**(3): 316-323.
- Vanhaesebroeck, B., J. Guillermet-Guibert, M. Graupera and B. Bilanges (2010). "The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(5): 329-341.
- Vanhoutte, P., J. V. Barnier, B. Guibert, C. Pages, M. J. Besson, R. A. Hipkind and J. Caboche (1999). "Glutamate induces phosphorylation of Elk-1 and CREB, along with c-fos activation, via an extracellular signal-regulated kinase-dependent pathway in brain slices." Mol Cell Biol **19**(1): 136-146.
- Vann, S. D. and M. M. Albasser (2011). "Hippocampus and neocortex: recognition and spatial memory." Curr Opin Neurobiol **21**(3): 440-445.
- Vicente, A. M., P. Galvao-Ferreira, F. Tecuapetla and R. M. Costa (2016). "Direct and indirect dorsolateral striatum pathways reinforce different action strategies." Curr Biol **26**(7): R267-269.
- Viggiano, D., L. Speranza, M. Crispino, G. C. Bellenchi, U. di Porzio, A. Iemolo, E. De Leonibus, F. Volpicelli and C. Perrone-Capano (2018). "Information content of dendritic spines after motor learning." Behav Brain Res **336**: 256-260.
- Vigo, D., G. Thornicroft and R. Atun (2016). "Estimating the true global burden of mental illness." Lancet Psychiatry **3**(2): 171-178.

- Volkers, M. and M. Sussman (2013). "mTOR/PRAS40 interaction: hypertrophy or proliferation." Cell Cycle **12**(23): 3579-3580.
- Volkman, J., C. Daniels and K. Witt (2010). "Neuropsychiatric effects of subthalamic neurostimulation in Parkinson disease." Nat Rev Neurol **6**(9): 487-498.
- Voorn, P., L. J. Vanderschuren, H. J. Groenewegen, T. W. Robbins and C. M. Pennartz (2004). "Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum." Trends Neurosci **27**(8): 468-474.
- Vorhees, C. V. and M. T. Williams (2014). "Assessing spatial learning and memory in rodents." ILAR J **55**(2): 310-332.
- Walf, A. A. and C. A. Frye (2007). "The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents." Nat Protoc **2**(2): 322-328.
- Wang, D., S. Zeesman, M. A. Tarnopolsky and M. J. Nowaczyk (2013). "Duplication of AKT3 as a cause of macrocephaly in duplication 1q43q44." Am J Med Genet A **161A**(8): 2016-2019.
- Wang, J. Q., E. E. Fibuch and L. Mao (2007). "Regulation of mitogen-activated protein kinases by glutamate receptors." J Neurochem **100**(1): 1-11.
- Wang, J. Q., Q. Tang, N. K. Parekar, Z. Liu, S. Samdani, E. S. Choe, L. Yang and L. Mao (2004). "Glutamate signaling to Ras-MAPK in striatal neurons: mechanisms for inducible gene expression and plasticity." Mol Neurobiol **29**(1): 1-14.
- Wang, P. S., M. Lane, M. Olfson, H. A. Pincus, K. B. Wells and R. C. Kessler (2005). "Twelve-month use of mental health services in the United States: results from the National Comorbidity Survey Replication." Arch Gen Psychiatry **62**(6): 629-640.
- Wang, Q., L. Liu, L. Pei, W. Ju, G. Ahmadian, J. Lu, Y. Wang, F. Liu and Y. T. Wang (2003). "Control of synaptic strength, a novel function of Akt." Neuron **38**(6): 915-928.
- Wang, Q., P. Yin, B. Yu, Z. Zhao, G. Richter-Levin, L. Yu and X. Cao (2017). "Down-regulation of dorsal striatal alphaCaMKII causes striatum-related cognitive and synaptic disorders." Exp Neurol **298**(Pt A): 112-121.
- Wang, X. and C. G. Proud (2006). "The mTOR pathway in the control of protein synthesis." Physiology (Bethesda) **21**: 362-369.

- Wassef, A., J. Baker and L. D. Kochan (2003). "GABA and schizophrenia: a review of basic science and clinical studies." J Clin Psychopharmacol **23**(6): 601-640.
- Wentholt, R. J., R. S. Petralia, J. Blahos, II and A. S. Niedzielski (1996). "Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons." J Neurosci **16**(6): 1982-1989.
- Wise, T., J. Radua, E. Via, N. Cardoner, O. Abe, T. M. Adams, F. Amico, Y. Cheng, J. H. Cole, C. de Azevedo Marques Perico, D. P. Dickstein, T. F. Farrow, T. Frodl, G. Wagner, I. H. Gotlib, O. Gruber et al. (2016). "Common and distinct patterns of grey-matter volume alteration in major depression and bipolar disorder: evidence from voxel-based meta-analysis." Mol Psychiatry.
- Wise, T., J. Radua, E. Via, N. Cardoner, O. Abe, T. M. Adams, F. Amico, Y. Cheng, J. H. Cole, C. de Azevedo Marques Perico, D. P. Dickstein, T. F. D. Farrow, T. Frodl, G. Wagner, I. H. Gotlib, O. Gruber et al. (2017). "Common and distinct patterns of grey-matter volume alteration in major depression and bipolar disorder: evidence from voxel-based meta-analysis." Mol Psychiatry **22**(10): 1455-1463.
- Wittchen, H. U., F. Jacobi, J. Rehm, A. Gustavsson, M. Svensson, B. Jonsson, J. Olesen, C. Allgulander, J. Alonso, C. Faravelli, L. Fratiglioni, P. Jennum, R. Lieb, A. Maercker, J. van Os, M. Preisig, L. Salvador-Carulla, R. Simon and H. C. Steinhausen (2011). "The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010." Eur Neuropsychopharmacol **21**(9): 655-679.
- Wiza, C., E. B. Nascimento and D. M. Ouwens (2012). "Role of PRAS40 in Akt and mTOR signaling in health and disease." Am J Physiol Endocrinol Metab **302**(12): E1453-1460.
- Wolfson, R. L. and D. M. Sabatini (2017). "The Dawn of the Age of Amino Acid Sensors for the mTORC1 Pathway." Cell Metab **26**(2): 301-309.
- Wong, P., Y. Sze, C. C. Chang, J. Lee and X. Zhang (2015). "Pregnenolone sulfate normalizes schizophrenia-like behaviors in dopamine transporter knockout mice through the AKT/GSK3beta pathway." Transl Psychiatry **5**: e528.
- Wright, I. C., S. Rabe-Hesketh, P. W. Woodruff, A. S. David, R. M. Murray and E. T. Bullmore (2000). "Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia." Am J Psychiatry **157**(1): 16-25.
- Wu, J., S. E. McCallum, S. D. Glick and Y. Huang (2011). "Inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway by rapamycin blocks cocaine-induced locomotor sensitization." Neuroscience **172**: 104-109.

- Wu, Y. and A. Parent (2000). "Striatal interneurons expressing calretinin, parvalbumin or NADPH-diaphorase: a comparative study in the rat, monkey and human." Brain Res **863**(1-2): 182-191.
- Xie, R., M. Cheng, M. Li, X. Xiong, M. Daadi, R. M. Sapolsky and H. Zhao (2013). "Akt isoforms differentially protect against stroke-induced neuronal injury by regulating mTOR activities." J Cereb Blood Flow Metab **33**(12): 1875-1885.
- Xu, M. Q., Q. H. Xing, Y. L. Zheng, S. Li, J. J. Gao, G. He, T. W. Guo, G. Y. Feng, F. Xu and L. He (2007). "Association of AKT1 gene polymorphisms with risk of schizophrenia and with response to antipsychotics in the Chinese population." J Clin Psychiatry **68**(9): 1358-1367.
- Xue, Q. L., H. Yang, H. F. Li, P. M. Abadir, T. N. Burks, L. G. Koch, S. L. Britton, J. Carlson, L. Chen, J. D. Walston and S. X. Leng (2016). "Rapamycin increases grip strength and attenuates age-related decline in maximal running distance in old low capacity runner rats." Aging (Albany NY) **8**(4): 769-776.
- Yang, H., D. G. Rudge, J. D. Koos, B. Vaidialingam, H. J. Yang and N. P. Pavletich (2013). "mTOR kinase structure, mechanism and regulation." Nature **497**(7448): 217-223.
- Yang, Z. Z., O. Tschopp, A. Baudry, B. Dummler, D. Hynx and B. A. Hemmings (2004). "Physiological functions of protein kinase B/Akt." Biochem Soc Trans **32**(Pt 2): 350-354.
- Yang, Z. Z., O. Tschopp, N. Di-Poi, E. Bruder, A. Baudry, B. Dummler, W. Wahli and B. A. Hemmings (2005). "Dosage-dependent effects of Akt1/protein kinase Balpha (PKBalpha) and Akt3/PKBgamma on thymus, skin, and cardiovascular and nervous system development in mice." Mol Cell Biol **25**(23): 10407-10418.
- Yang, Z. Z., O. Tschopp, M. Hemmings-Mieszczak, J. Feng, D. Brodbeck, E. Perentes and B. A. Hemmings (2003). "Protein kinase B alpha/Akt1 regulates placental development and fetal growth." J Biol Chem **278**(34): 32124-32131.
- Yin, H. H., S. P. Mulcare, M. R. Hilario, E. Clouse, T. Holloway, M. I. Davis, A. C. Hansson, D. M. Lovinger and R. M. Costa (2009). "Dynamic reorganization of striatal circuits during the acquisition and consolidation of a skill." Nat Neurosci **12**(3): 333-341.
- Yip, C. K., K. Murata, T. Walz, D. M. Sabatini and S. A. Kang (2010). "Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition." Mol Cell **38**(5): 768-774.

- Young, A. H. (2017). "Lithium for long-term treatment of unipolar depression." Lancet Psychiatry **4**(7): 511-512.
- Yuskaitis, C. J., M. A. Mines, M. K. King, J. D. Sweatt, C. A. Miller and R. S. Jope (2010). "Lithium ameliorates altered glycogen synthase kinase-3 and behavior in a mouse model of fragile X syndrome." Biochem Pharmacol **79**(4): 632-646.
- Zalcman, G., N. Federman and A. Romano (2018). "CaMKII Isoforms in Learning and Memory: Localization and Function." Front Mol Neurosci **11**: 445.
- Zanassi, P., M. Paolillo, A. Feliciello, E. V. Avvedimento, V. Gallo and S. Schinelli (2001). "cAMP-dependent protein kinase induces cAMP-response element-binding protein phosphorylation via an intracellular calcium release/ERK-dependent pathway in striatal neurons." J Biol Chem **276**(15): 11487-11495.
- Zhang, W., J. Wu, M. D. Ward, S. Yang, Y. A. Chuang, M. Xiao, R. Li, D. J. Leahy and P. F. Worley (2015). "Structural basis of arc binding to synaptic proteins: implications for cognitive disease." Neuron **86**(2): 490-500.
- Zhang, X., R. R. Gainetdinov, J. M. Beaulieu, T. D. Sotnikova, L. H. Burch, R. B. Williams, D. A. Schwartz, K. R. Krishnan and M. G. Caron (2005). "Loss-of-function mutation in tryptophan hydroxylase-2 identified in unipolar major depression." Neuron **45**(1): 11-16.
- Zheng, W., H. Wang, Z. Zeng, J. Lin, P. J. Little, L. K. Srivastava and R. Quirion (2012). "The possible role of the Akt signaling pathway in schizophrenia." Brain Res **1470**: 145-158.
- Zhou, M., W. Li, S. Huang, J. Song, J. Y. Kim, X. Tian, E. Kang, Y. Sano, C. Liu, J. Balaji, S. Wu, Y. Zhou, Y. Zhou, S. N. Parivash, D. Ehninger, L. He, H. Song, G. L. Ming and A. J. Silva (2013). "mTOR Inhibition ameliorates cognitive and affective deficits caused by Discl knockdown in adult-born dentate granule neurons." Neuron **77**(4): 647-654.